

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE  
BOMBESINA / PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM  
NEOPLASIAS PULMONARES**

Jane Mattei

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Tese de Doutorado

Porto Alegre, Janeiro de 2011

**M435a** Mattei, Jane

Análise da expressão de receptores de bombesina/peptídeo liberador de gastrina em neoplasias pulmonares / Jane Mattei ; orient. Gilberto Schwartzmann. - 2011.  
148 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Neoplasias pulmonares 2. Marcadores biológicos de tumor 3. Receptores da bombesina 4. Peptídeo liberador de gastrina 5. Diagnóstico I. Schwartzmann, Gilberto II. Título.

NLM: WF 658

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## Dedicatórias

Ao meu esposo, Carlos Henrique, pelo nosso profundo amor e carinho, pelo constante incentivo e por ter sido um companheiro incansável.

Aos meus pais, Dorival e Mari, por serem meus exemplos de persistência e de batalha na vida.

Aos meus irmãos , especialmente minha irmã Adriana, por nossa amizade e pela importante colaboração nesta tese.

Aos meus sogros, Carlos e Evelin, pela amizade e por terem-me acolhido tão carinhosamente na família.

## Agradecimentos

Quero expressar minha gratidão ao ensino público brasileiro, instituição que proporcionou meu desenvolvimento intelectual do ensino básico ao doutorado.

Aos pacientes que contribuíram para a realização deste trabalho. A eles o meu imenso respeito, carinho e esperança de que este trabalho possa contribuir para que eles tenham um futuro com uma melhor qualidade de vida.

Ao meu orientador professor Gilberto Schwartzmann que me inspirou a amar a ciência e a pesquisa na oncologia. Agradeço pelo entusiasmo e ensinamentos que tanto me ajudaram a realizar este trabalho.

A Dra. Rosane Achcar, patologista do National Jewish, pela colaboração importante nesta tese e pelo constante apoio e carinho.

À Rosana da Fundação SOAD, pela competência e pela ajuda em todos os momentos.

Ao colega Dr. Yasufumi Kato da Universidade de Tóquio pelos pacientes e pelo suporte.

Ao apoio e à colaboração do laboratório de biomarcadores moleculares do professor Fred Hirsch da Universidade do Colorado.

# Sumário

<b>1</b>	<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Resumo</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Câncer de Pulmão</b>	<b>14</b>
3.1	Epidemiologia . . . . .	14
3.2	Fatores de Risco . . . . .	16
3.3	Apresentação Clínica . . . . .	18
3.3.1	Síndromes Paraneoplásicas . . . . .	20
3.4	Histologias . . . . .	21
3.4.1	Neoplasias Não-Pequenas Células de Pulmão (NSCLC)	21
3.4.2	Neoplasias de Pequenas Células de Pulmão (SCLC) . .	28
3.5	Diagnóstico e Estadiamento . . . . .	30
3.5.1	Estadiamento da Neoplasia Pulmonar Não-Pequenas Células . . . . .	32
3.5.2	Estadiamento da Neoplasia Pulmonar de Pequenas cé- lulas . . . . .	34
3.6	Tratamento e Terapias-Alvo no Câncer de Pulmão . . . . .	35
3.6.1	Tratamento das Neoplasias Não-Pequenas Células de Pulmão . . . . .	35
3.6.2	Tratamento das Neoplasias de Pequenas Células de Pulmão . . . . .	39
3.7	Biologia Molecular do Câncer de Pulmão . . . . .	41
3.7.1	Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) . . . . .	42
3.7.2	Gene KRAS . . . . .	47
3.7.3	Gene EML4-ALK . . . . .	51
3.7.4	Gene Supressor Tumoral P53 . . . . .	52
3.8	Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP) e seus Receptores . . .	54
3.8.1	GRPR como um Receptor Acoplado à Proteína G . . .	56
3.8.2	Peptídeo Liberador de Gastrina e Câncer . . . . .	61
3.8.3	Antagonistas do GRPR . . . . .	66
3.8.4	Peptídeo Liberador de Gastrina no Desenvolvimento Pulmonar e na Transformação Neoplásica . . . . .	69
3.8.5	Pró-GRP . . . . .	73
<b>4</b>	<b>Objetivos do Estudos</b>	<b>76</b>
4.1	Objetivo Geral . . . . .	76
4.2	Objetivos Específicos . . . . .	76

<b>5</b>	<b>Justificativa</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>79</b>
6.1	População Brasileira . . . . .	79
6.1.1	Análise de Imuno-histoquímica . . . . .	80
6.2	População Japonesa . . . . .	82
6.2.1	Construção de Blocos de Microarray (TMA) . . . . .	82
6.2.2	Análise de Imuno-histoquímica . . . . .	83
6.2.3	Sequenciamento de DNA para Detecção de Mutação no EGFR . . . . .	84
6.3	Avaliação Estatística . . . . .	85
<b>7</b>	<b>Resultados</b>	<b>85</b>
7.1	População Brasileira . . . . .	85
7.1.1	Características Gerais dos Pacientes . . . . .	85
7.1.2	Expressão de GRPR em Diferentes Histologias de Câncer de Pulmão . . . . .	87
7.1.3	Distribuição do GRPR e Gênero . . . . .	89
7.1.4	Relação da Expressão de GRPR nos Estágios Clínicos . . . . .	91
7.1.5	Expressão de GRPR em Tecidos Pulmonares sem Neoplasia . . . . .	92
7.1.6	GRPR e Tabagismo . . . . .	93
7.1.7	Curvas de Sobrevida . . . . .	94
7.2	População Japonesa . . . . .	95
7.2.1	Características Gerais dos Pacientes . . . . .	95
7.2.2	Expressão de GRPR em Diferentes Histologias . . . . .	97
7.2.3	Mutação do Gene EGFR e Expressão de GRPR . . . . .	99
7.2.4	Estágio Clínico e Expressão de GRPR . . . . .	100
7.2.5	Distribuição do GRPR em Relação ao Gênero . . . . .	101
7.2.6	Curvas de Sobrevida . . . . .	102
7.2.7	GRPR e Tabagismo . . . . .	103
7.2.8	Comparação entre População Japonesa e Brasileira na Expressão de GRPR . . . . .	104
<b>8</b>	<b>Discussão</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Conclusões</b>	<b>110</b>
9.1	Apêndice A - Artigo Científico . . . . .	127

## Lista de Figuras

1	Mortalidade em Homens e Mulheres . . . . .	15
2	Mutações conhecidas em adenocarcinomas. . . . .	39
3	Caminhos de sinalização intracelular do EGFR . . . . .	43
4	Sinalização entre o EGFR e o GRPR . . . . .	58
5	Diferentes intensidades de expressão de GRPR nas amostras tumorais estudadas (A) Ausência de Expressão (B) Fraca Expressão (C) Moderada Expressão (D) Forte Expressão ( <i>Magnificação Original x 400</i> ) . . . . .	81
6	Representação de uma lâmina de TMA com 24 amostras de pacientes . . . . .	83
7	Expressão de GRPR nos diferentes tipos histológicos de neoplasias pulmonares dos pacientes ocidentais . . . . .	89
8	Distribuição de intensidades de expressão GRPR nos sexos masculino e feminino . . . . .	90
9	Intensidades de expressão de GRPR nos estágios clínicos dos tumores pulmonares dos pacientes brasileiros . . . . .	92
10	Expressão de GRPR em tecido pulmonar com presença e ausência de neoplasia . . . . .	93
11	Curvas de sobrevida dos pacientes brasileiros em relação aos níveis de expressão de GRPR . . . . .	95
12	Expressão de GRPR nos diferentes tipos histológicos de neoplasias pulmonares das amostras de pacientes orientais . . . . .	98
13	Expressão de GRPR em relação à presença e à ausência de mutação no EGFR . . . . .	100
14	Intensidades de expressão de GRPR nos estágios clínicos dos tumores pulmonares nos pacientes japoneses . . . . .	101
15	Distribuição do GRPR em homens e mulheres da amostra de pacientes orientais . . . . .	102
16	Curvas de sobrevida dos pacientes japoneses em relação aos níveis de expressão de GRPR . . . . .	103
17	Diferenças de expressão de GRPR em relação ao status tabagismo . . . . .	104
18	Comparação da expressão de GRPR em pacientes japoneses vs. brasileiros . . . . .	105
19	Intensidades de expressão de GRPR em adenocarcinomas de pacientes ocidentais e orientais . . . . .	106

## Lista de Tabelas

1	Características clínicas e demográficas dos pacientes da população ocidental (n=238) . . . . .	87
2	Frequências de intensidades de expressão de GRPR nos diferentes grupos histológicos . . . . .	89
3	Características clínicas e demográficas dos pacientes da população oriental (n=96) . . . . .	97
4	Frequências de Expressão de GRPR nos Diferentes Grupos Histológicos . . . . .	99



## Lista de Abreviaturas

ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
ADH	Antidiuretic Hormone
AE1/AE3	Cytokeratin AE1/AE3
AkT	Akt Protein kinase
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato Cíclico
BLPs	Bombesin-like Peptides
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMET	MET or MNNG HOS Transforming gene
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EML4-ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) -Echinoderm Microtubule-associated Protein-like 4 (EML4) gene
ERK	Extracellular Signal-regulated Protein Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factors
GHRH	Growth-hormone-releasing Hormone
GRPR	Gastrin-releasing peptide receptor
HER1	Receptor tyrosine-protein kinase 1
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3	Receptor tyrosine-protein kinase 3
HER4	Receptor tyrosine-protein kinase 4
HR	Hazard Ratio
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IL-1	Interleukin-1
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase

NSCLC Non-Small Cell Lung Cancer  
p44/42-MAPK p44/42 Mitogen-activated Protein Kinase  
p53 Tumor Gene p53  
PECAM-1 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
PI3K Phosphatidylinositol 3-kinases  
ProGRP Pro-gastrin-releasing Peptide  
PTH Parathyroid Hormone  
Raf Proto-oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase  
RC3095 bombesin receptor antagonist  
RC3940 bombesin receptor antagonist  
RNAm Messenger RNA  
SCLC Small Cell Lung Cancer  
SNC Sistema Nervoso Central  
STAT3 Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
TNF Tumor Necrosis Factor  
TNM TNM Classification of Malignant Tumours (Tumour,Nodes,Metastasis)  
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor  
WHO Histological Classification of Tumours of the Lung

# 1 Abstract

Lung cancers are the leading cause of cancer-related death worldwide. Outcome measures are very discouraging as even with the most advanced treatment strategies, about 86% of lung cancer patients die within 5 years of diagnosis. Most of the histologies are non-small cell (NSCLC) that accounts for 85% of all lung cancer. The NSCLC is often diagnosed at an advanced stage and has a poor prognosis. Palliative chemotherapy in advanced or metastatic NSCLC is associated with only a modest survival prolongation and improved quality of life.

The increase understanding of tumor biology and availability of drugs targeting key biological mechanism required for tumour development provide an opportunity to further improve the outcome of patients with lung cancer. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) are overexpressed in several neoplasms and plays a critical role in tumor cell survival, proliferation, migration and invasion. However the expression of this peptide has not been very explored in different histologies and clinical stages of lung cancer. Our aim was: (1) to identify GRPR expression in both non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC); (2) to correlate its expression with clinical stages and demographic variables; (3) to compare GRPR expression in Asian and non-Asian population. Was used standard immunohistochemistry to evaluate GRPR expression in 238 lung cancer of Brazilian patients and 96 lung cancer of Japanese patients.

The different intensity GRPR expression was visible between SCLC and NSCL, mainly in high expression of this biomarker. In NSCLC have 48% weak; 16.5% moderate; 7.5% strong expression compared to 34.21% weak; 15.78% moderate; 2.63% strong in SCLC. When the group of non-small cell was separated, a conspicuous high expression was seen in adenocarcinomas (10% strong expression) in relation to other histologies. In clinical stages, GRPR expression was more pronounced in stage III and IV of NSCLC and extensive disease of SCLC than earlier stages of this disease. When compared both populations, GRPR expression was more present in Japanese population with 92.85% than Brazilian patients with 62.50% ( $p= 0,001$ ).

Conclusions: We have shown for the first time that GRPR is expressed differently in clinical stages and highly expressed in histologies not known before. Furthermore, this biomarker has, as EGFR, a distinct behavior in Asian and non-Asian patients. Undoubtedly, GRP participate as an important growth factor in mediate progression and metastasis development in lung cancer. These findings can identify this biomarker as possible biological target for development of a new approach to the treatment of lung cancer.

## 2 Resumo

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo. As medidas adotadas atualmente ainda permanecem desanimadoras, apesar das mais avançadas estratégias de tratamento, pois 86% dos pacientes com neoplasias pulmonares morrem dentro de cinco anos do diagnóstico. A maioria das histologias das neoplasias pulmonares são os carcinomas não-pequenas células que acometem cerca de 85% de todos os tumores pulmonares. Esse grupo histológico é frequentemente diagnosticado em estágios avançados da doença e, por isso, apresenta um pobre prognóstico. A quimioterapia paliativa na doença avançada, ou metastática, está associada apenas com um modesto aumento da sobrevida e com uma melhora da qualidade de vida .

O aumento na compreensão da biologia tumoral para o desenvolvimento de drogas alvo que são chave nos mecanismos biológicos requeridos para o desenvolvimento tumoral, é a oportunidade para melhorar os resultados de pacientes com câncer de pulmão. Os peptídeos liberadores de gastrina (GRPR) são superexpressos em vários tumores e desempenham um papel crítico na proliferação, migração e invasão celular. Entretanto, a expressão deste peptídeo não tem sido muito explorada nas diferentes histologias e estágios clínicos das neoplasias pulmonares.

Neste estudo, a meta foi: (1) identificar a expressão de GRPR, tanto em neoplasias não-pequenas células (NSCLC), quanto em neoplasias de pequenas células (SCLC); (2) correlacionar a expressão deste marcador com estágios clínicos e variáveis demográficas dos pacientes envolvidos no estudo; (3) comparar a expressão de GRPR em pacientes asiáticos e não-asiáticos. Foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica para avaliar a expressão de GRPR em 238 pacientes brasileiros com câncer de pulmão e em 96 pacientes japoneses com a mesma neoplasia.

Os resultados mostraram uma diferença visível na intensidade de expressão de GRPR entre os pacientes com NSCLC, comparados àqueles com SCLC. Os pacientes com NSCLC apresentaram 48% fraca, 16,5% moderada e 7,5% forte expressão de GRPR, comparados a 34,21% fraca; 15,78% moderada; 2,63% forte expressão deste marcador em SCLC. Quando o grupo de NSCLC foi separado nos subtipos histológicos, a alta expressão de GRPR foi maior nos adenocarcinomas (10%) em relação às outras histologias. Quanto aos estágios clínicos, a expressão de GRPR foi muito mais pronunciada nos estágios III e IV dos NSCLC e em doença extensa dos SCLC em relação à doença mais precoce. Quando o GRPR foi comparado em ambas populações, observou-se que a expressão foi maior nos pacientes japoneses com 92,85% comparados aos pacientes brasileiros com 62,50% ( $p=0,001$ ).

Ficou demonstrado, pela primeira vez, que o GRPR apresenta um comportamento distinto nos diferentes estágios clínicos do câncer de pulmão. Esta expressão marcada em estágios avançados das neoplasias pulmonares indica que o receptor de GRPR pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de tumores com comportamento biológico agressivo. Ele também se mostrou ser fortemente expresso nas neoplasias não-pequenas células de pulmão, especialmente nos adenocarcinomas. Além disso, este biomarcador molecular tem, assim como o EGFR, um comportamento distinto em pacientes asiáticos e não-asiáticos. Por isso, novos estudos deverão abordar este marcador molecular como possível alvo terapêutico para o tratamento das neoplasias pulmonares.

## 3 Câncer de Pulmão

### 3.1 Epidemiologia

O câncer de pulmão é a maior causa de mortalidade por câncer em todo o mundo, e provavelmente é esperado ser o maior problema de saúde num futuro próximo. As neoplasias pulmonares causam mais mortes do que as quatro mais comuns neoplasias combinadas que incluem mama, cólon, pâncreas e próstata. Além disso, tem uma das menores taxas de sobrevivência em cinco anos, perdendo apenas para tumores pancreáticos. As projeções sugerem que o câncer de pulmão será uma das poucas doenças em que a mortalidade continuará a aumentar em escala global, pelo menos, nos próximos dez anos [1]. Esta neoplasia representa a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres em estatísticas norte-americanas com, aproximadamente, 170.000 mortes, em 2008, acometendo cerca de 30 % de mortes por câncer. Nesse mesmo ano, foi estimado que houve 215.020 novos casos diagnosticados nos EUA e, aproximadamente, 1,60 milhões de casos foram diagnosticados, em todo o mundo, com 1.37 milhões de mortes em 2008 [2].

A incidência do câncer de pulmão nos homens declinou depois do pico da década de 80. Nas mulheres, no entanto, o modelo diferiu significativamente, pois a incidência mais que dobrou entre as últimas três décadas, alcançando proporções epidêmicas na atualidade. Na década de 50, era responsável por 3% de todas as mortes por câncer nas mulheres. Em 2009, este número aumentou para 28% de todas as mortes por câncer nesse grupo. Foi estimado nesse mesmo ano, que, nos EUA, mais de 30 mil mulheres morreram de câncer de pulmão (71.030 mortes em homens e em mulheres) do que de câncer de

mama (40.480 mortes). Segundo a incidência de casos novos desta neoplasia em mulheres, aumentou cerca de 600% nos últimos oitenta anos [?]. Veja abaixo a representação da mortalidade global de câncer de pulmão em homens e em mulheres (Figura adaptada de Ahmedin Jemal et al [1]).

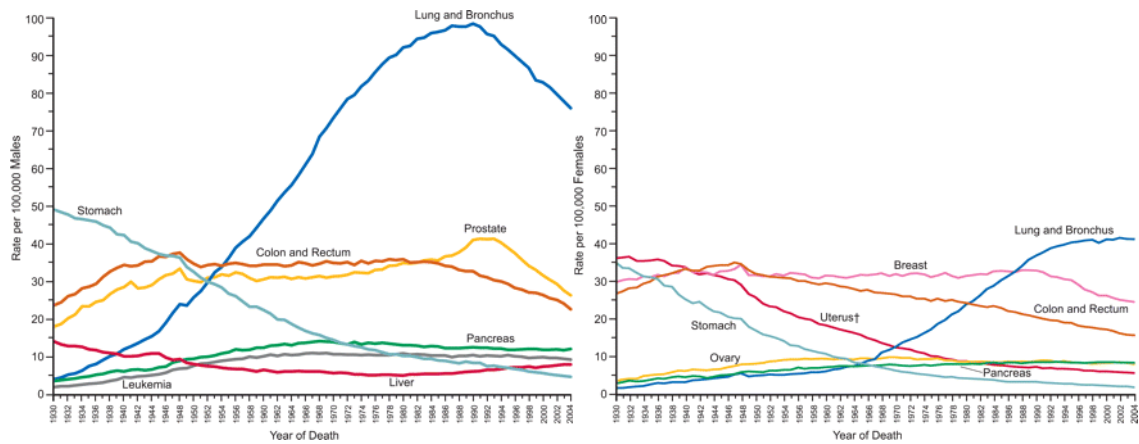


Figura 1: Mortalidade em Homens e Mulheres

No Brasil, a incidência de câncer de pulmão tem aumentado nas últimas décadas, e sua mortalidade permanece elevada, de forma similar ao que acontece no restante do mundo. Também é a primeira causa de morte por câncer entre os homens, porém é a segunda causa de morte entre as mulheres. O número de casos novos de câncer de pulmão, estimados para o ano de 2010, será de 17.800 para homens e 9.830 para as mulheres. Dentre as regiões brasileiras, a região sudeste e sul são as que apresentam as maiores taxas de carcinoma pulmonar, especialmente o Rio Grande do Sul [3][4].

Apesar dos avanços no tratamento com combinações de novas drogas, quimioterapia e radioterapia, ainda cerca de 85-90% dos pacientes com câncer de pulmão morrem em cinco anos do diagnóstico. Com a detecção precoce, as taxas de sobrevivência em cinco anos melhoraria significativamente de 20%,

nos pacientes com estágio clínico III, para 70% em pacientes com doença em estágio clínico I. O diagnóstico precoce sofre limitações devido ao fato de que a doença geralmente se desenvolve de forma assintomática, nos estágios mais precoces, e os métodos diagnósticos disponíveis não são totalmente confiáveis [5].

### **3.2 Fatores de Risco**

A associação entre câncer de pulmão e tabagismo é forte e está bem estabelecida, sendo responsável por mais de 90% das neoplasias pulmonares. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) [6], o câncer de pulmão é a mais proeminente causa de morte relatada ao tabagismo, superando mesmo as mortes de origem cardíaca ou doença pulmonar obstrutiva crônica. O tabagismo aumenta o risco de todos os tipos histológicos de câncer de pulmão, porém a mais forte associação está com as histologias epidermóides, seguidos de carcinomas de pequenas células, e por último os adenocarcinomas. Nesse último subtipo histológico vem crescendo a associação com o tabagismo, principalmente em países ocidentais [7][8].

Os determinantes de risco do tabagismo são dependentes do tempo de exposição, do número de cigarros por dia, da idade de início, do tipo de cigarro, da profundidade de inalação, da suscetibilidade de desenvolver neoplasia e, além disso, da história familiar. Além do tabaco, há outras substâncias que contribuem para o desenvolvimento de câncer de pulmão, como asbestos, níquel, sílica, e poluentes atmosféricos. No entanto, os referidos fatores são responsáveis por uma modesta fração de casos desta neoplasia [8].

A exposição a carcinógenos presentes no tabaco conduzem à aquisição



de mutações genéticas que podem iniciar a carcinogênese. Entretanto, nem todas as neoplasias pulmonares se originam de tabagistas, e nem todos os tabagistas apresentam câncer de pulmão. Assim, fatores herdados provavelmente estão envolvidos e podem predispor os indivíduos ao desenvolvimento desta neoplasia, por aumentarem a suscetibilidade ao dano dos efeitos do cigarro, ou por aumentarem a predisposição, desconsiderando a história de tabagismo [9].

Em relação à predisposição ao câncer de pulmão, os estudos mostram que as mulheres apresentam uma doença biológica e uma história natural distinta em relação aos homens para o desenvolvimento desta neoplasia. De modo geral, as taxas de sobrevida em cinco anos para as mulheres com esta doença apresentam-se em 15,6%, comparadas com 12,4% para os homens. Por exemplo, as mulheres apresentam sobrevida maior depois da ressecção cirúrgica em doenças em estágio precoce e também sobrevivem mais tempo com doença metastática comparadas aos homens [10].

Por outro lado, apesar de viverem mais tempo com a neoplasia do que os do sexo masculino, alguns trabalhos demonstram que as mulheres são mais suscetíveis aos efeitos carcinógenos do cigarro do que o sexo oposto. Um estudo com 800 pacientes que comparou a associação de tabagismo e câncer mostrou que a razão de chances de desenvolvimento de câncer de pulmão nos que fumavam 40 maços/ano foi de 27,9 em mulheres e de 9,6 em homens [11]. Esse estudo foi corroborado por outro trabalho com 4.000 pacientes, o qual demonstrou que as mulheres tabagistas apresentaram 1,5 vezes maior risco de desenvolver câncer de pulmão que os homens, quando avaliados para o mesmo número de cigarros/dia [12].

Sabe-se que a distribuição histológica é distinta entre os dois sexos, pois as mulheres fumantes desenvolvem, mais frequentemente, adenocarcinomas do que carcinomas epidermóides, os quais são muito mais comuns em homens. Dos pacientes não tabagistas, na maioria das vezes, há desenvolvimento de adenocarcinomas, sendo que são 2,5 vezes mais prováveis ocorrerem em mulheres do que homens. Portanto, as grandes diferenças na distribuição histológica e na maior suscetibilidade ao desenvolvimento desta neoplasia podem ser explicadas por diferenças genéticas, biológicas e fatores hormonais [?].

### **3.3 Apresentação Clínica**

As manifestações clínicas do câncer de pulmão são muito variáveis. Cerca de 5 a 10 % dos pacientes apresentam-se assintomáticos ao diagnóstico, principalmente ocorrendo quando os tumores se encontram nas áreas mais periféricas do pulmão. Em um estudo com 600 pacientes, ficou demonstrado que os pacientes que eram sintomáticos ao diagnóstico já apresentavam doença avançada. Nessa série, apenas 27% apresentavam sintomas ao diagnóstico relatados ao tumor primário como tosse ou hemoptise. A maioria dos pacientes referiu queixas relatadas à doença metastática ou a sintomas constitucionais inespecíficos como anorexia, fadiga, perda de peso e dor óssea. Vários estudos mostram que os pacientes que assintomáticos ao diagnóstico e que não apresentam anormalidades, em exames laboratoriais, terão uma maior sobrevida, pois é muito improvável que apresentem doença metastática [13].

Entre as manifestações clínicas de doença localizada, as mais frequentes são tosse, dispnéia e hemoptise. A tosse está presente no momento do diagnóstico da neoplasia pulmonar em 50% das vezes, ocorrendo em quase todos

os pacientes com doença que não é mais curável. Ela pode ter origem em muitos fatores como a presença de um tumor central na via aérea, pneumonia obstrutiva, envolvimento linfonodal e derrame pleural. A dispnéia também é um sintoma usual que pode ser causada pelo próprio tumor ou pela doença pulmonar obstrutiva crônica subjacente.

Convém salientar que a hemoptise também se faz presente em grande parte dos pacientes e consiste, mais comumente, em escarro com raias de sangue. A hemoptise maciça é muito incomum em pacientes com neoplasia pulmonar [14].

Os sintomas clínicos mais clássicos de doença avançada em pacientes com câncer de pulmão são a Síndrome de Veia Cava Superior, o estridor, a rouquidão e a Síndrome de Pancoast. A rouquidão é quase sempre causada pelo envolvimento do nervo laríngeo recorrente, resultando de paralisia de cordas vocais. Sinais de envolvimento desse nervo sugerem, na maioria das vezes, uma doença avançada e não mais suscetível à ressecção cirúrgica.

A Síndrome de Veia Cava Superior é uma complicação relativamente comum em pacientes com câncer de pulmão, tanto em NSCLC quanto em SCLC e é considerada uma emergência médica. É geralmente consequência da obstrução da veia cava por adenopatia paratraqueal ou extensão central do tumor primário no lobo superior direito. A extensão e a severidade dos sintomas dependem de quão rapidamente a obstrução progride e também, da velocidade de desenvolvimento de circulação colateral [14].

Outra síndrome muito frequente em pacientes com neoplasia pulmonar, e que indica, na maioria das vezes, doença avançada é a Síndrome de Pancoast. Ela é caracterizada por plexopatia cervical causada pela presença de tumor

no ápice do pulmão com invasão de estruturas adjacentes, causando dor em parede torácica e ombro. Pode ser acompanhada também, por Síndrome de Horner que se caracteriza por constrição pupilar, ptose palpebral e anidrose, com dano do tronco nervoso simpático cervical [14].

### **3.3.1 Síndromes Paraneoplásicas**

As síndromes paraneoplásicas são frequentes em pacientes com câncer de pulmão, porém são clinicamente aparentes em apenas 10 a 20% deles. São menos comuns em adenocarcinomas do que outros tipos histológicos. Elas não estão presentes como reflexo da extensão da doença, mas sim, em alguns pacientes, pode ser o único sintoma da doença nos estágios iniciais. Os mecanismos etiológicos desta síndrome ainda não estão bem compreendidos, mas podem estar relacionados a substâncias liberadas pelo tumor, ou mesmo, como uma resposta imunológica à presença da neoplasia.

A liberação de alguns peptídeos secretados pelos tumores podem mimetizar a atividade dos hormônios pituitários. Cerca de 10% apresentam atividade anormal do ACTH, “ACTH like,” com o desenvolvimento de diabetes e Síndrome de Cushing. Alguns produzem hormônios antidiuréticos como o ADH, levando à retenção de líquidos, edema e alterações de eletrólitos [14].

Sintomas neurológicos também podem estar presentes nas síndromes paraneoplásicas como alterações sensoriais, neuropatias autoimunes e encefalomielite. Em alguns pacientes, os sintomas neurológicos podem ocorrer meses antes de o tumor ser diagnosticado [15].

A hipercalcemia faz-se presente, principalmente, em pacientes com carcinomas epidermóides, sendo que é quase patognomônico desta histologia.

Vários mecanismos patológicos têm sido propostos como lesões ósseas metastáticas, liberação de paratormônios como o PTH, IL-1, TNF, prostaglandinas e linfotoxinas. Portanto, a hipercalcemia está associada geralmente a pacientes com doença avançada [14].

### **3.4 Histologias**

As neoplasias pulmonares são classificadas em dois grandes grupos, os carcinomas não-pequenas células (NSCLC) e os de pequenas células (SCLC). Os primeiros são a maioria, com 80% de todos os tumores pulmonares, sendo que os últimos acometem cerca de 20%. Esta classificação está baseada na característica das células, mas, principalmente, no fato que estes dois grupos histológicos apresentam comportamento clínico e respondem ao tratamento de forma completamente diferente um do outro [13].

#### **3.4.1 Neoplasias Não-Pequenas Células de Pulmão (NSCLC)**

As neoplasias não-pequenas células de pulmão representam um conjunto bastante heterogêneo de histologias. As mais comuns dentro desse grupo são os carcinomas epidermóides, os adenocarcinomas e os carcinomas de grandes células. Estas histologias são classificadas dentro de um mesmo grupo porque a abordagem diagnóstica, o estadiamento, o prognóstico e o tratamento são similares.

Os grupos histológicos serão abordados detalhadamente nos próximos capítulos deste texto.

## **Adenocarcinomas**

Os adenocarcinomas são o tipo histológico mais frequente, acometendo cerca de 45% de todas as neoplasias pulmonares, com taxas de crescimento na maioria dos países. Embora a maioria dos casos sejam observados em tabagistas, desenvolvem-se mais comumente que as outras histologias em pacientes que nunca tenham fumado, principalmente em mulheres [16].

Comparados com outras neoplasias pulmonares, os adenocarcinomas são mais frequentemente periféricos e apresentam-se como nódulos pequenos, geralmente menores de 4 cm, os quais raramente cavitam. Uma característica comum desta neoplasia é o envolvimento da parede torácica e da pleura, muito mais frequentemente que nos outros tumores. Muito incomumente, os adenocarcinomas apresentam-se em localização central como uma massa hilar ou perihilar, por isso, são diagnosticados, em muitos casos, através do escarro [13].

Os adenocarcinomas podem ser únicos ou múltiplos, e o modelo de disseminação é pela via linfática ou hematogênica. A disseminação aerógena também ocorre, mas basicamente é mais típica de carcinomas bronquiolo-alveolares, formando lesões separadas da principal e em diferentes lobos. Muitas vezes, a disseminação destes tumores se dá via superfície pleural, mimetizando os mesoteliomas.

Cerca de 20% dos adenocarcinomas diagnosticados já apresentam metástases a distância, sendo que o sistema nervoso central, os ossos, a adrenal e o fígado são os locais preferenciais de acometimento de metástases. Quando a ressecção cirúrgica é possível, as chances de recidiva são muito menos fre-

quentes do que os outros tipos histológicos [14].

De acordo com a Classificação Histológica Internacional de Tumores (WHO Classification), os adenocarcinomas são classificados em cinco subtipos histológicos: acinar, papilar, sólido com produção de mucina, bronquioloalveolares e adenocarcinomas mistos. O modelo mais comum é o tipo acinar em que as células formam estruturas parecidas com glândulas ou estruturas tubulares. As formas menos frequentes são as formas papilares, micropapilares e arranjos em anel de sinete. A significância clínica destas últimas estruturas são relacionadas com um pobre prognóstico [13].

A maioria dos adenocarcinomas, cerca de 90%, são heterogêneos, consistindo de dois ou mais subtipos histológicos em um mesmo tumor, sendo portanto, categorizados como mistos. A diferenciação histológica, característica que distingue os adenocarcinomas de outros carcinomas invasivos, são a diferenciação glandular e/ou a produção de mucina. Os elementos glandulares e os vacúolos de mucina dos adenocarcinomas são organizados em diferentes modelos que, deste modo, podem ser divididos em diferentes subgrupos [13].

Em relação às características de imuno-histoquímica, esses tumores variam de acordo com o grau e o subtipo de adenocarcinoma. A expressão de marcadores epiteliais como AE1/AE3 e antígeno carcinoembriônico são típicos.

A graduação dos adenocarcinomas em bem, moderado e pobremente diferenciados está baseada na semelhança dos adenocarcinomas nas características acinares e papilares, com o tecido pulmonar normal. O grau histológico tem implicação prognóstica importante. Em geral, pacientes com adenocarcinomas, pobremente diferenciados, apresentam maiores taxas de recorrência

local e maior número de metástases em linfonodos que pacientes com a histologia moderada e bem diferenciada. Além disso, os subtipos, como os papilares e os micropapilares, por si só, já carregam um mau prognóstico, independente do grau de diferenciação. Os estudos sugerem que o alto grau do tumor, a presença de necrose, de invasão linfática e de mais 25% de componente papilar são fortes indicadores de comportamento agressivo do tumor [14][17].

### **Carcinomas Epidermóides**

Aproximadamente 29% dos tumores pulmonares são carcinomas epidermóides, sendo que 90% deles estão relacionados aos pacientes tabagistas. O arsênico também é uma substância que fortemente está associada a esta histologia [18].

A maioria destas neoplasias de células escamosas, cerca de 70%, apresentam-se como tumores centrais na via aérea, crescendo como grandes massas centrais que podem cavitari. Quando estão localizados no sulco superior do pulmão, são chamados tumores de Pancoast, pois comumente estão associados com a destruição de arcos costais posteriores, ocasionando, muitas vezes, a Síndrome de Horner. Similarmente às outras neoplasias pulmonares, disseminam-se primariamente tanto pela via linfática, quanto pela hematogênica [14].

A característica principal destas células são o desenvolvimento de pérolas de queratina e pontes intercelulares, podendo desenvolver áreas irregulares de necrose central descritas como necrose geográfica. Uma característica im-



portante destes tumores é o componente estromal, que consiste na perda de tecido fibroblástico com um componente inflamatório constituído de células plasmáticas, macrófagos e linfócitos. Embora todas estas características sejam claramente aparentes em carcinomas epidermóides bem diferenciados, são difíceis de serem encontradas naqueles pobremente diferenciados, levando-se em conta que nestes há constitutivamente menos queratinização e pontes intercelulares. A maioria dos carcinomas epidermóides expressam citoqueratinas, queratinas de alto peso molecular (34BE12) e antígeno carcinoembriônico através da técnica de imuno-histoquímica [19].

Tipicamente, os carcinomas epidermóides são localmente agressivos, pois se estendem diretamente às células adjacentes, substituindo o tecido pré-existente. São encontrados, mais frequentemente, substituindo os septos alveolares do que a superfície da parede dos alvéolos. Os carcinomas bem diferenciados costumam apresentar invasão local em linfonodos e diretamente dentro do tórax envolvendo estruturas adjacentes. Por outro lado, os carcinomas pobremente diferenciados produzem metástases precocemente para órgãos distantes, preferencialmente para o cérebro, o fígado e para as adrenais. No entanto, a frequência em que ocorrem estas metástases são muito menores que as produzidas pelos adenocarcinomas [20].

As anormalidades genéticas são comuns nos carcinomas epidermóides, assim como na maioria dos NSCLC. As mutações no gene p53 são bastante frequentes nesta histologia, assim como a expressão do EGFR por imuno-histoquímica, que se encontra presente em torno de 84%. No entanto, as mutações no gene do EGFR e do KRAS acontecem, mais frequentemente, nos adenocarcinomas [21].

Para o diagnóstico histológico, a biópsia endobrônquica é o procedimento mais comumente utilizado, pois como estes carcinomas se localizam principalmente em áreas centrais da via aérea, podem ser de mais fácil acesso pelo endobrônquio. Ao diagnóstico, o estágio da doença e a performance clínica dos pacientes são os mais importantes indicadores prognósticos para sobrevida, embora o grau de diferenciação da histologia também seja importante. Portanto, se compararmos estágio por estágio, as taxas de sobrevida de carcinoma de células escamosas é significativamente melhor que dos adenocarcinomas. Aproximadamente 80% dos pacientes em estágio I (T1N0M0) com carcinoma de células escamosas estarão vivos em cinco anos comparados com apenas 60-70% dos pacientes com adenocarcinomas. Diferenças similares são vistas também nos estágios II destas duas histologias [14].

### **Carcinomas de Grandes Células**

Os carcinomas de grandes células acometem cerca de 9% de todas as neoplasias primárias de pulmão. Também, como vistos nos tipos histológicos anteriores, os carcinomas de grandes células predominam em indivíduos tabagistas, com exceção do subtipo linfóepitelioma. Em oposição aos adenocarcinomas, a maioria dos pacientes diagnosticados com esta histologia são do sexo masculino [13].

Os sintomas são comuns, assim como os outros tipos de neoplasias de não pequenas células de pulmão. A ocorrência desses tumores é predominantemente periférica, assim como nos adenocarcinomas, apresentando-se como grandes massas, que frequentemente invadem a pleura visceral, a parede torá-

cica e as estruturas adjacentes. O modelo de disseminação desses carcinomas é também hematogênica e linfогênica. As metástases ocorrem, mais comumente, em linfonodos hilares ou mediastinais seguidas por metástases para a pleura, os ossos, o cérebro e o pericárdio.

As neoplasias de grandes células não são diferenciadas, isto é, não apresentam características de carcinomas de pequenas células, de carcinomas epidermóides ou de adenocarcinomas, por isso, na maioria das vezes, são um diagnóstico de exclusão. A pobre diferenciação sem características histológicas que permitem qualquer identificação de estruturas, faz com que esse tumor tenha um comportamento biológico muito agressivo. Embora alguns estudos tenham sugerido que a origem do tumor de grandes células não está bem definida, a análise ultraestrutural tem revelado alguns esboços de diferenciação glandular [13].

Caracteristicamente, as células são grandes com presença de nucléolos proeminentes e com citoplasma claramente visível. As células tumorais estão dispostas em forma de ninho e, visivelmente, apresentam numerosas mitoses, sendo que a presença de necrose é muito comum. O grupo desta neoplasia de grandes células é bastante heterogêneo, pois inclui os subtipos de células claras, grandes células com fenótipo rabdóide, grandes células com componente neuroendócrino e, por último, o carcinoma tipo-linfoepitelioma [14].

Em relação a alterações moleculares, muito poucos estudos têm sido relatados com relação à ocorrência de anormalidades moleculares específicas desta neoplasia. Sabe-se que algumas alterações genéticas e moleculares são semelhantes a outras histologias não-pequenas células de pulmão como, por exemplo, as mutações do gene p53 e do gene KRAS [13].

Os critérios para a determinação de prognóstico dos carcinomas de grande células são idênticos aos aplicados para os NSCLC.

### **3.4.2 Neoplasias de Pequenas Células de Pulmão (SCLC)**

Os carcinomas de pequenas células comprometem cerca de 15 a 20% de todas as neoplasias pulmonares e estão associados intimamente com o tabagismo. Eles estão agrupados isoladamente dos NSCLC, porque apresentam um comportamento biológico distinto dos demais. Costumam ser muito mais agressivos, sendo que, sem tratamento, a média de sobrevida é apenas 2 a 4 meses [22][14].

Como o nome já refere, é composto por pequenas células com escasso citoplasma, células redondas, ovais e fusiformes. O núcleo é, geralmente, finamente granular, com tendência a se tornar facilmente deformado pelo contato com as outras células e estruturas. São tumores altamente proliferativos com elevada contagem de mitoses [23][13].

Tais tumores se apresentam tipicamente, como tumores com localização central, hilar ou perihilar com infiltração de submucosa brônquica e tecido peribrônquico. Na maioria das vezes, esses tumores tem um aspecto de grandes massas e com presença de extensa necrose. No momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes já se tem metástases em linfonodos. A tendência de disseminação rápida pela via hematogênica e linfогênica, fez com que o estadiamento não seguisse o sistema TNM como nas demais histologias, mas sim, fosse classificado como doença limitada ou extensa. Os detalhes da descrição do estadiamento clínico serão abordados em sessão específica deste texto

[14][24].

Os sintomas clínicos dos pacientes que apresentam carcinoma de pequenas células estão mais relacionados à doença disseminada como, por exemplo, a presença de metástases hepáticas ou cerebrais, já que estes tumores se disseminam precocemente. Ao diagnóstico, as metástases cerebrais não são muito frequentes, porém elas tendem a se desenvolver durante o curso da doença, devido à agressividade do tumor. Além disso, estes tumores produzem sintomas relacionados às síndromes paraneoplásicas que, classicamente nesta histologia, incluem a síndrome inapropriada do hormônio antidiurético, degeneração cerebelar paraneoplásica, entre outras [25].

Em relação à imuno-histoquímica, os carcinomas de pequenas células são positivos para CD56, cromogranina e sinaptofisina. A característica que distingue os carcinomas de pequenas células é a expressão de marcadores neuroendócrinos como a cromogranina e sinaptofisina, que se mostram positivos em mais de 90% das vezes. Em menos de 10% dos casos, os carcinomas de pequenas células demonstram uma combinação de histologias de NSCLC.

Vários são os fatores de mau prognóstico em pacientes que apresentam SCLC, sendo que mais importantes são a presença de doença extensa, uma pobre performance clínica do paciente ao diagnóstico, elevados níveis séricos de LDH, fosfatase alcalina e baixos níveis de albumina e de sódio. Nestes tumores, os fatores genéticos ou histológicos não foram considerados fatores preditivos de prognóstico de forma tão importante quanto nas outras histologias já citadas.

Em relação à biologia molecular dos SCLC, estes apresentam altas taxas de mutação no gene p53, sendo um gene muito mais frequentemente mutado

que nas histologias dos NSCLC, contribuindo assim para o comportamento agressivo deste tumor. Além do já citado gene, ocorre também a inativação do gene do retinoblastoma (RB) de forma quase universal nos pacientes com SCLC [14][13].

### 3.5 Diagnóstico e Estadiamento

O tipo histológico e o estadiamento do tumor são as duas variáveis mais importantes na análise prognóstica do câncer do pulmão. A amostra tecidual adequada para realização da análise patológica da neoplasia pulmonar é importante para realizar o diagnóstico histológico com precisão. Várias opções são disponíveis como: amostra de escarro, lavado broncoalveolar, biópsia broncoscópica ou por toracoscopia e material cirúrgico ressecado [14].

Após a análise do tipo histológico da neoplasia pulmonar, segue-se o sistema de estadiamento o qual tem, como objetivo principal, a avaliação da extensão do tumor no tórax e em órgãos distantes. Ele tem a função também de classificar os pacientes para determinado tipo de tratamento, ou seja, desde a ressecção cirúrgica até o tratamento paliativo. Os exames para estadiamento, de modo geral, incluem exame físico, tomografias de tórax e abdômen e testes laboratoriais sanguíneos. O sistema de avaliação da extensão do câncer do pulmão baseia-se na análise do tumor primário, na avaliação dos linfonodos regionais e no envolvimento do tumor a distância. O sistema TNM foi proposto originalmente por Denoix, em 1946, e já sofreu várias modificações, ao longo do tempo, no sentido de aperfeiçoá-lo [14][24].

O estadiamento do câncer de pulmão tem sido alterado recentemente em 2009 pela IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), como resultado da sétima edição da classificação do TNM, pois, mais acuradamente, correlaciona-se com extensão anatômica e prognóstico da doença. Foram analisados 67.725 pacientes com NSCLC com um seguimento de cinco anos. A análise por Kaplan-Meier, através das curvas de sobrevida, revelou que tumores T1 com até 2 cm de tamanho, apresentavam sobrevida maior quando comparados àqueles com mais de 2 cm. Por conseguinte, a classificação de tumores T1a e T1b foram introduzidas. Outras alterações importantes foram feitas como, por exemplo, pacientes com tumores T4, devido à presença de nódulos pulmonares tumorais no mesmo lobo do tumor primário, passaram para a categoria T3. Além disso, pacientes com derrame pleural ou pericárdio neoplásico foram classificados como M1, ou seja, metastáticos [26].

O estadiamento para os SCLC permanece classificado como doença limitada e extensa. A definição de doença limitada se refere ao tumor que se enquadra em um campo de radioterapia, geralmente, quando a doença for confinada a um hemitóra, em que se localiza o tumor primário (incluindo o mediastino e linfonodos supraclaviculares). Por outro lado, doença extensa é referida a tumores que apresentam metástases além do tórax, que são equivalentes ao estágio IV em NSCLC.

Abaixo, o novo estadiamento das neoplasias pulmonares [26].

### 3.5.1 Estadiamento da Neoplasia Pulmonar Não-Pequenas Células

- **T-Tumor Primário**

- Tx- Tumor primário não pode ser avaliado
- T0- Sem evidência de tumor primário
- Tis- Carcinoma in situ
- T1- tumor  $\leq 3$ cm nas maiores dimensões, circundado por pulmão ou pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão mais proximal que o brônquio lobar)
- T1a Tumor  $\leq 2$  cm na maior dimensão
- T1b Tumor  $> 2$  cm mas não  $> 3$  cm na na maior dimensão
- T2 Tumor  $> 3$  e  $< 7$ cm na maior dimensão ou compromete o brônquio principal, com 2 cm ou mais distalmente à carina ou invade a pleura visceral ou associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva que se estende até a região hilar, mas não envolve todo o pulmão
- T2a Tumor  $> 3$  cm e  $\leq 5$  cm na maior dimensão
- T2b Tumor  $> 5$  cm e  $\leq 7$  cm na maior dimensão
- T3 Tumor  $> 7$ cm que invade diretamente a parede torácica, o diafragma, o nervo frênico, a pleura mediastinal, o pericárdio parietal tumor do brônquio principal com menos de 2 cm distalmente à carina, mas sem envolvimento da mesma; ou tumor associado com



atelectasia ou pneumonite obstrutiva. Presença de mais que um nódulo no mesmo lobo pulmonar

- T4 Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina; presença de nódulos pulmonares em diferentes lobos ipsilaterais

- **N-Linfonodos**

- NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
- N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais
- N1 Metástase em linfonodos peribrônquicos e/ou hilares homolaterais e nódulos intrapulmonares, incluindo o comprometimento por extensão direta
- N2 Metástase em linfonodo(s) mediastinal(ais) homolateral(ais) e/ou em linfonodo(s) subcarinal(ais)
- N3 Metástase em linfonodo(s) mediastinal(ais) contralateral(ais), hilar(es) contralateral(ais), escaleno(s) homo- ou contralateral(ais), ou em linfonodo(s) supra-clavicular(es)

- **M- Metástase a Distância**

- MX A presença de metástase a distância não pode ser avaliada

- M0 Ausência de metástase a distância
- M1a Nódulos tumorais em lobos contralaterais e/ou presença de nódulos pleurais ou derrame pleural ou derrame pericárdico
- M1b metástases a distância

O agrupamento por estágios está sumarizado abaixo:

- TX N0 M0- Carcinoma Oculto
- Estágio 0- Tis N0 M0
- Estágio IA- T1 N0 M0
- Estágio IB- T2 N0 M0
- Estágio IIA- T1 N1 M0
- Estágio IIB-T2 N1 M0 / T3 N0 M0
- Estágio IIIA- T1 N2 M0/ T2 N2 M0/ T3 N1 M0/ T3 N2 M0
- Estágio IIIB- qualquer T N3 M0/ T4 qualquer N M0
- Estágio IV-qualquer T qualquer N M1

### **3.5.2 Estadiamento da Neoplasia Pulmonar de Pequenas células**

- **Doença Limitada**

- Confinada a um hemitórax

- Metástase supraclavicular unilateral
- Doença tratável por um único campo de radioterapia

- **Doença Extensa**

- Pacientes com presença de doença extratorácica
- Derrame pleural
- Doença intratorácica extensa que não pode ser tratada com um campo de radioterapia.

## **3.6 Tratamento e Terapias-Alvo no Câncer de Pulmão**

### **3.6.1 Tratamento das Neoplasias Não-Pequenas Células de Pulmão**

O sucesso do tratamento para os pacientes com câncer de pulmão ainda permanece uma tarefa difícil. Ele continua sendo um dos tumores mais desafiantes pois, infelizmente, as taxas de sobrevida em cinco anos não têm sido muito alteradas nos últimos 30 anos. As taxas de sobrevida variam entre 10 a 15% em cinco anos [27].

A maioria dos pacientes com NSCLC morrem como resultado de sua doença em 1 a 2 anos após o diagnóstico. Muitos fatores são responsáveis pela baixa sobrevida, principalmente pelos fatos de que a maior parte dos pacientes é diagnosticada com doença avançada e pela falta de adequados métodos

para detectar doença precoce. Além disso, pacientes tabagistas apresentam comorbidade clínicas cardiovasculares que dificultam o tratamento cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico.

O manejo cirúrgico de pacientes com NSCLC ainda permanece a única modalidade terapêutica de cura desta neoplasia. Do ponto de vista cirúrgico, apenas os pacientes diagnosticados com estágios clínicos de I a IIIA, têm indicação de ressecção das lesões com intensão curativa. Mesmo após a cirurgia, a quimioterapia adjuvante, baseada em platina, está indicada e tem trazido uma melhora da sobrevida global em 5 anos nos pacientes com EC II a IIIA. O benefício do tratamento adjuvante nos pacientes com EC IB não é muito claro. Pacientes com EC IA não têm indicação de quimioterapia após a cirurgia [28][29]

No entanto, apesar de a ressecção cirúrgica ser a melhor opção terapêutica, poucos pacientes conseguem alcançar uma longa sobrevida livre de doença, ou mesmo a cura da neoplasia. Infelizmente, a pequena fração de pacientes diagnosticados com doença precoce, apresentam condições clínicas adequadas para se submeterem à ressecção pulmonar. A maioria apresenta doença pulmonar obstrutiva crônica e comorbidades cardíacas decorrentes do tabagismo que impossibilitam a realização de uma pneumectomia, ou mesmo, de uma lobectomia. Além disso, um significativo número de doentes que realizam cirurgia, sofre recidiva da doença, geralmente com metástases extratorácicas. A sobrevida média é de aproximadamente 4 a 5 meses e as taxas de sobrevida em um ano são em torno de 10% em casos de pacientes que apenas receberam medidas de suporte [14][1].

Os pacientes com doença localmente avançada e que não são candida-

tos à cirurgia, EC IIIB, são normalmente considerados para tratamento com a combinação de quimioterapia e radioterapia para estabelecer o controle da doença. Salienta-se que combinações de quimioterapia com duas drogas, sendo que uma delas deve ser uma platina, é o esquema de tratamento padrão. A quimioterapia não apenas fornece citorredução das lesões, mas também contribui para radiosensibilizar e para erradicar micrometástases do tumor a distância. Cerca de 30 a 40% dos pacientes que são tratados com quimioterapia de primeira linha serão candidatos a tratamento de segunda linha, se bem que que, nesta fase, seja recomendado tratamento com apenas uma droga [14] [28].

Até muito recentemente, todos os pacientes com NSCLC com doença avançada, com boa performance clínica beneficiavam-se de quimioterapia com duas drogas como primeira linha. No entanto, estudos de Fase I e II com inibidores de tirosino quinase, gefitinib e erlotinib, demonstraram respostas tumorais importantes em cerca de 10% dos pacientes que apresentavam, anteriormente, resistência à quimioterapia convencional. Atualmente, o tratamento com estes inibidores de tirosino quinase foram aprovados como primeira linha para NSCLC com doença avançada [30][31].

No tratamento dos pacientes com doença metastática, além da palição para melhora dos sintomas clínicos, podem-se observar taxas de resposta de até 20 a 30%. Além disso, ocorre uma melhora na sobrevida mediana de oito a nove meses, comparados com apenas quatro a seis meses em pacientes com suporte clínico [32]. Além do aumento na sobrevida dos pacientes com doença avançada, através do uso de drogas inibidoras de tirosino quinase, tais pacientes puderam também se beneficiar de drogas inibidoras da angio-

gênese, como o bevacizumabe. Este anticorpo monoclonal tem alta afinidade ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pacientes com NSCLC. Sandler et al, em estudo de Fase III, demonstrou um benefício com adição desta droga em primeira linha em combinação com platina e taxano, com aumento da sobrevida em 2 a 3 meses [33]. Esta droga mostrou benefício apenas em pacientes com NSCLC de histologia não epidermóide, quando em combinação com quimioterapia. Um estudo recente mostrou que, para pacientes com histologia epidermóide, esta droga está contra-indicada pelo risco de hemoptise importante, podendo haver um desfecho fatal nestes pacientes. O objetivo principal de realizar tratamento em pacientes com doença avançada, que são incuráveis, é muito mais realizar um controle da doença para não apenas maximizar quantidade, mas sobretudo a qualidade de vida [34].

Mais recentemente, novos protocolos com terapias-alvo têm a finalidade de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com câncer de pulmão. O maior conhecimento da biologia molecular, por meio do estudo do comportamento celular na progressão do tumor e no surgimento das metástases, pode facilitar o desenvolvimento de novas drogas. O foco de pesquisa atual é buscar uma melhor terapêutica, baseada na classificação de algoritmos, que procuram a presença de alterações genéticas e também a expressão de marcadores celulares [35]. Estes podem ser usados para identificar drogas ou agentes terapêuticos com ação específica em determinados receptores de membrana que apresentam papel crítico no crescimento e na sobrevivência das células. Já se conhecem, por exemplo, muitas mutações presentes em histologias dos adenocarcinomas, como nos genes KRAS, EGFR e EML4-ALK.

No entanto, apesar de todos os esforços que têm sido feitos até o momento, mais de 50% destas alterações moleculares permanecem desconhecidas, e apenas se pode identificar alvos terapêuticos em 20% destes tumores [9][36].

Abaixo, está melhor representado por meio de um diagrama das mutações conhecidas em adenocarcinomas (Figura adaptada de Lucian R. Chirieac [37]).

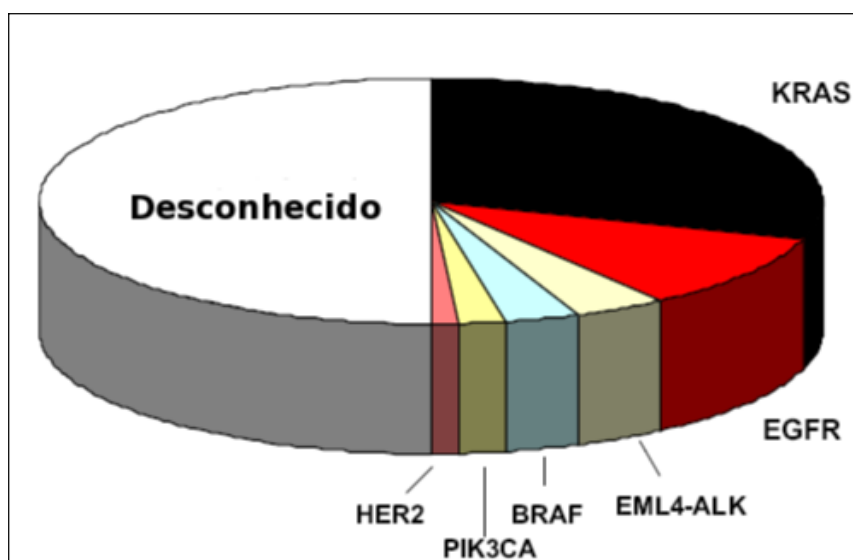


Figura 2: Mutações conhecidas em adenocarcinomas.

### 3.6.2 Tratamento das Neoplasias de Pequenas Células de Pulmão

Nos últimos 20 anos, tem aumentado o interesse na melhor maneira de se manejar os pacientes com SCLC. No entanto, a compreensão da biologia molecular dos SCLC ainda permanece pobre e muito pouco se tem avançado em termos de melhora nas modalidades terapêuticas nesta histologia de câncer de pulmão. O prognóstico destes pacientes é determinado não apenas pela

extensão da doença, mas também, pela performance clínica. Os marcadores tumorais são fatores prognósticos independentes [14][38].

No momento do diagnóstico, dois terços dos pacientes com SCLC apresentam doença disseminada, fazendo com que a quimioterapia seja o principal tratamento. Os carcinomas deste grupo histológico são altamente sensíveis a drogas quimioterápicas, sendo que cerca de 60 a 80% dos pacientes alcançam respostas objetivas. No geral, a sobrevida dos pacientes com doença limitada, submetidos à quimioterapia, varia entre 18 e 20 meses, e, nos pacientes com doença extensa, a sobrevida varia de 8 a 12 meses. No entanto, as recidivas são muito frequentes, pois as respostas ao tratamento, na maiorias das vezes, são apenas temporárias. De 15% a 20% dos pacientes com doença limitada e menos de 5% daqueles com doença extensa estarão livres da doença por mais de 2 anos [5].

Os regimes de drogas quimioterápicas também são baseados em platina, com duas drogas, sendo que a cisplatina e o etoposide ainda permanecem o tratamento padrão. Pacientes que apresentam doença limitada devem ser manejados com radioterapia concomitante ao esquema etoposide e cisplatina, pois esta última é radiosensibilizante. Muito embora, apesar de o tratamento combinado ser muito mais eficaz, poucos pacientes conseguem tolerá-lo, devido aos efeitos adversos importantes. A toxicidade hematológica é o fator limitante desta combinação de tratamento [39][14].

Recentemente, a radioterapia profilática em sistema nervoso central (SNC), para pacientes recém-diagnosticados com carcinomas de pequenas células de pulmão, tem desempenhado um importante papel no manejo terapêutico, principalmente nos pacientes que apresentam doença limitada. Estes paci-



entes têm 60% de risco de desenvolvimento de metástases cerebrais em 2 a 3 anos do início do tratamento. Uma metanálise mostrou uma diminuição da ocorrência de metástases cerebrais através da irradiação profilática, melhorando, assim, a sobrevida livre de progressão e sobrevida global dos pacientes com SCLC [40].

### 3.7 Biologia Molecular do Câncer de Pulmão

De modo geral, a transformação maligna das células pulmonares, na maioria das vezes, é caracterizada por instabilidade genética que pode ocorrer ao nível cromossomal com perda ou ganho de material, translocações ou instabilidade microssatélite. O dano ao telômero no final do cromossomo está associado à instabilidade genômica, conduzindo a anormalidades cromossômicas. Importante salientar o fato de que o comprimento do telômero regula a capacidade replicativa das células, ou seja, a cada processo de replicação o telômero torna-se cada vez mais curto, até que, em um determinado ponto do telômero, a célula sofre apoptose. Portanto, a ativação da telomerase em células pré-malignas evita a perda do telômero, tornando as células imortalizadas. Acredita-se que este fenômeno ocorra em mais de 85% das neoplasias não-pequenas células, e em quase 100 % das neoplasias de pequenas células de pulmão [9][14].

Outros eventos moleculares que conduzem ao processo intracelular de inicialização do desenvolvimento neoplásico são as mutações em genes críticos na regulação do crescimento e diferenciação celular. Os mais relevantes ca-

minhos de sinalização celular no câncer de pulmão, incluem os membros da família do EGFR, cMyC, RAS e STAT3. Os protooncogenes são frequentemente ativados por mutações genéticas, principalmente do KRAS e do EGFR, e rearranjos cromossômicos tais como translocações e inversões como EML4-ALK. Outros mecanismos de ativação de protooncogenes, descobertos recentemente, são as amplificações de genes, como, por exemplo, do EGFR, do HER2, do KRAS e do CMET, entre outros. No entanto, o verdadeiro significado destas amplificações genéticas no câncer de pulmão estão ainda em investigação [36][14].

A seguir, serão detalhados os principais fatores de crescimentos e mutações que ocorrem no câncer de pulmão.

### **3.7.1 Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)**

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) desempenha um papel importante na diferenciação, manutenção e desenvolvimento celular. Ele está presente em células normais como células de origem epidérmica, mesenquimal e neurogênica. Quando o EGF se liga ao seu receptor EGFR, os caminhos de sinalização são ativados, conduzindo assim à proliferação celular [41].

O gene do EGFR está localizado no braço curto do cromossomo 7, apresentando 27 introns e 28 exons. Este fator de crescimento pertence à grande família HER/erB de receptores de tirosino quinase, que incluem também HER1, HER2, HER3 e HER4. Os referidos receptores são todos compostos por um domínio ligante extracelular transmembrana e um intracelular

tirosino quinase. O EGFR transmite sinais de crescimento do domínio extracelular para o interior do citoplasma, emitindo estímulos para o núcleo através da transdução de sinal, levando à síntese proteica. Os caminhos de sinalização, no interior das células, através do EGFR, são mediados pelas Ras/MAPK (proteína quinase de atividade mitogênica), PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), STAT e receptores acoplados à proteína G, como os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) [35][42].

Na figura 3, está representado o receptor EGFR com suas interações intracelulares (Figura adaptada de Source BioScience).

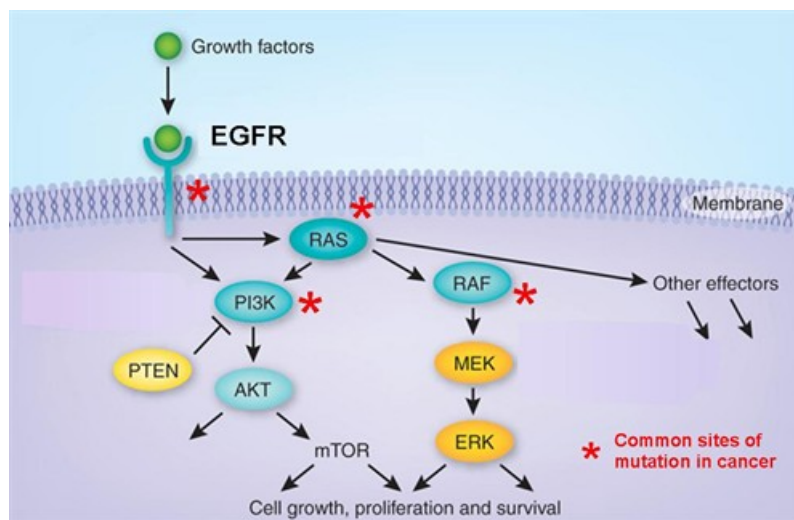


Figura 3: Caminhos de sinalização intracelular do EGFR

A superexpressão do gene do EGFR, devido à mutação, ou mesmo à alteração estrutural do receptor, conduz à carcinogênese de forma facilitada. O EGFR desempenha um dos mais importantes fatores de crescimento e proliferação nas neoplasias pulmonares. Em 2004, foram descobertas mutações intracitoplasmáticas do gene EGFR em NSCLC, especialmente em adenocarcinomas, nos quais são mais frequentes. Na forma normal, o domí-

nio quinase do EGFR normalmente está na sua forma inativa, pois existe uma auto-inibição da sua atividade. Consta-se que, quando existe a mutação do domínio tirosino quinase do EGFR, ocorre a desestabilização da conformação do receptor. O resultado é a constante ativação do EGFR e da cascata de sinalização intracelular, principalmente do Akt e STAT que têm funções antiapoptóticas e de crescimento celular. As mutações podem ocorrer em muitos sítios dos exons 18 ao 21 do EGFR, porém cerca de 85-90% das mutações consistem em deleções no éxon 19 e mutações ponto no éxon 21 [41][14].

Em relação às características clinicopatológicas, os pacientes que carregam mutações do EGFR geralmente são jovens, com predominância no sexo feminino, não tabagistas e de etnia asiática. De modo geral, as mutações são mais comuns em mulheres, do que em homens (42% versus 14%), em indivíduos que nunca fumaram em relação aos tabagistas (51% versus 10%), muito mais frequentes em adenocarcinomas do que em outras histologias (40% versus 3%). Em relação à etnicidade, a prevalência de mutações são significativamente maiores na população oriental, revelando até 50% de mutações neste grupo populacional. Por outro lado, nos países ocidentais, estas mutações não ultrapassam de 8 a 15%. Todas estas diferenças significativas da presença de mutações, em subgrupos populacionais com características próprias, sugerem fortemente que diferentes etiologias e mecanismos podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de pulmão [43][41].

Além disso, as mutações do domínio do EGFR são mais prevalentes em alguns subtipos especiais de adenocarcinomas, embora a literatura ainda seja muito conflitante a este respeito. O carcinoma bronquioloalveolar é o subtipo

histológico em que se tem mais discutido sobre estar relacionado com mutações no EGFR. Uma análise de 139 pacientes com NSCLC revelou que as mutações do EGFR foram significativamente mais frequentes entre pacientes que apresentavam características bronquioloalveolares do que os que não apresentavam (38% vs. 14%,  $p < 0.001$ ) [44], embora alguns estudos tenham falhado em demonstrar esta associação. Outros trabalhos sugerem que a predominância de características papilares na histologia seja um fator preditivo de resposta aos inibidores de tirosino quinases, sugerindo que as mutações no EGFR poderiam ser mais comuns entre este subtipo de adenocarcinoma. O estudo de Ohtsuka et al encontrou uma associação entre as mutações no EGFR e o subtipo papilar. Encontrou também uma associação com esta mutação, quando havia a presença de apenas focos de carcinoma bronquioloalveolar, sugerindo que ambos são importantes preditores de mutações no EGFR. Por outro lado, a literatura é mais clara quando sugere que os adenocarcinomas com características mucinosas, raramente estão associados com a presença de mutações no EGFR, mas sim com a presença de mutações no gene do KRAS [45][46].

As mutações no gene do EGFR são muito importantes na prática clínica, pois definem um novo grupo de pacientes com NSCLC que poderiam ser tratados mais efetivamente por específicas terapias-alvo. Quando mutado, ele está intimamente correlacionado com a maior sensibilidade e é considerado um poderoso preditor de resposta a drogas inibidoras de tirosino quinases, como gefitinib e erlotinib. Estes dois quimioterápicos já foram aprovados para uso em adenocarcinomas com mutações no EGFR, pois são capazes de inibir, de forma eficaz, a tirosino quinase do domínio intracelular do EGFR.

Em um estudo de Thatcher, com 1692 pacientes, demonstrou que o gefitinibe foi capaz de aumentar a sobrevida em pacientes asiáticos e não tabagistas, revelando que estes pacientes apresentavam mutações mais frequentes [31].

Estudo de Eberhard et al, em subanálise de 228 pacientes, que haviam sido testados para mutação do EGFR, demonstrou que os pacientes com mutação no EGFR apresentaram significativamente melhores resultados clínicos, incluindo sobrevida, comparados com pacientes que não apresentaram mutações no EGFR, independentemente do tipo de terapia aplicada [47]. Um trabalho de Sasaki et al, com 95 pacientes com NSCLC, mostrou que os 35 pacientes que carregavam a mutação no EGFR apresentaram uma sobrevida significativamente melhor que os 60 pacientes com EGFR não mutado ( $p=0,014$ ). Portanto, as evidências são cada vez mais fortes de que os pacientes que apresentam este gene mutado têm um melhor prognóstico e uma maior sobrevida que aqueles que não carregam a mutação, independentemente de qualquer tratamento recebido [48].

Recentemente, identificou-se que, além da presença de mutação do EGFR, podem também apresentar aumento no número de cópias ou ampliações deste gene. Vários estudos mostram que o aumento do número de cópias está associado à maior agressividade e à mais pobre diferenciação do tumor. Um estudo de Lynette et al, com 99 pacientes asiáticas e não tabagistas, demonstrou que as ampliações genéticas estiveram associadas com a mais rápida progressão tumoral, com estágios clínicos mais avançados e com uma menor diferenciação histológica [49]. No entanto, um estudo realizado de Liu et al, com 187 pacientes com NSCLC, revelou resultados contrários ao estudo anterior. Tanto os pacientes com mutações no EGFR, quanto os

que apresentavam amplificações do gene tiveram maior sobrevida global que aqueles sem estas alterações. As informações prognósticas em relação às amplificações genéticas ainda são muito discordantes e, por isso, melhores estudos são necessários para consolidar o seu verdadeiro papel na biologia molecular do câncer de pulmão [50].

Considerável esforço tem sido feito na tentativa de desvendar quais os mecanismos moleculares subjacentes que estão envolvidos nas grandes diferenças que existem das taxas de respostas objetivas e sobrevida global ao tratamento com inibidores de tirosino quinases entre asiáticos e não-asiáticos. Vários estudos clínicos têm sido relatados, mostrando que pacientes asiáticos com mutações no EGFR, que receberam gefitinibe como primeira linha, apresentaram taxas de respostas em até 75%. Por outro lado, pacientes de populações caucasianas, que receberam o mesmo tratamento e tiveram a mesma mutação, apresentaram respostas de 50%. Em estudos de pacientes que foram tratados com segunda linha terapêutica, com as mesmas drogas, também foram relatadas diferenças significativas. A população oriental apresentou respostas de 76-90%, enquanto que em não-asiáticos, as respostas variaram de 50 a 70%. Tais resultados sugerem que deve haver outros receptores coadjuvantes, ou mesmo proteínas na cascata de sinalização do EGFR, que são diferentes entre a população ocidental e a oriental [51, 35].

### **3.7.2 Gene KRAS**

O gene KRAS é outro proto-oncogene frequentemente mutado em pacientes com câncer de pulmão. A família deste gene codifica a proteína KRAS

que é uma GTPase. Esta é responsável por muitas vias de transdução de sinal que regulam o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a morte celular por interagir com múltiplos efetores, incluindo a proteino-quinase (MAPK) e os ativadores da transcrição (STAT3).

As mutações no gene RAS são muito mais frequentes nos codons 12, 13 e 61. No entanto, cerca de 80 a 90% destas mutações ocorrem nos dois primeiros, 12 e 13. A mutação do códon 61 é relativamente rara. Estas mutações resultam na ativação de determinadas proteínas consideradas oncogenes, e são essenciais para o desenvolvimento e o crescimento de muitos tumores como do cólon, do pâncreas e de pulmão [14][52].

Dentre as histologias de câncer de pulmão, novamente os adenocarcinomas são os que mais frequentemente carregam as mutações no gene do KRAS. As freqüências giram em torno de 5 a 40%, sendo que, muito ocasionalmente, estão presentes em carcinomas epidermóides e pequenas células. Além disso, vários outros estudos foram ao encontro dos achados de Marchetti et al que demonstrou que, dentre os adenocarcinomas, o subtipo mucinoso é o que mais frequentemente apresentava esta mutação. Na amostra deste autor, 100% dos adenocarcinomas mucinosos carregavam a mutação comparados com apenas 23% dos não-mucinosos [53]. Entretanto, em um recente estudo de Okudela e colaboradores, foi relatado que a presença de mutações não foi estatisticamente diferente entre o subtipo mucinoso 16%, contra os não-mucinosos com 20%. Estes estudos nos levam a concluir que a associação entre a ocorrência de mutações no gene KRAS e o subtipo histológico de adenocarcinoma é ainda bastante controversa, e não está completamente estabelecida [54].

As diferenças étnicas das mutações também ocorrem com este gene, as-



sim como das mutações do EGFR. Os principais estudos mostraram que as diferenças nas frequências nos grupos étnicos são significativas e o comportamento é oposto ao que ocorre com as mutações no EGFR. Em média, elas ocorrem entre 5 a 15% na população asiática e 25 a 50 % na população ocidental [54][52].

As mutações no gene do KRAS, ao inverso do que ocorre com as mutações do EGFR, são mais frequentemente em pacientes do sexo masculino e em tabagistas, pois se acredita que os produtos do cigarro sejam uma causa direta no desenvolvimento de mutações deste gene [14]. Entretanto, todos os mecanismos que conduzem à mutação no KRAS são pouco conhecidos, ou seja, qual a intensidade e duração do tabagismo que são necessárias para o desenvolvimento de alterações neste gene. Um estudo recente de Riely et al com 500 pacientes demonstrou que as mutações no KRAS ocorreram em 22% no total de pacientes, sendo presentes em 15% dos não-tabagistas. Ele também constatou que, especificamente, o tipo de mutação do KRAS entre estes dois grupos foram diferentes. As mutações com substituições do tipo G→A ocorreram mais comumente em não-tabagistas, enquanto que as mutações do tipo G→T ou G→C foram mais encontradas em tabagistas. Estes achados importantes sugerem que o tabagismo está associado com apenas alguns tipos de mutações do KRAS, mas não em todas as mutações [52][35].

Vários trabalhos têm relatado que pacientes que apresentam a mutação do KRAS têm um pior prognóstico em relação à sobrevida dos que não carregam a mutação. Uma metanálise de Mascaux et al, com 53 estudos, avaliando a relação de mutações no KRAS com os resultados clínicos em pacientes com NSCLC, evidenciou que a presença de mutações no KRAS seria um fator

prognóstico negativo, com risco relativo de 1,40 (95% IC, 1,26-1,80). Porém, esta metanálise falhou em demonstrar esta associação negativa, quando realizada a análise multivariável com os outros fatores prognósticos, como performance e estágio clínico [55].

Outros trabalhos mostraram que a mutação do KRAS está relacionada com os estágios avançados da doença. As frequências de mutações no KRAS foram de 12,5% em nódulos únicos, 40% em tumores com nódulos satélites e 60% de presença da mutação quando havia disseminação intratorácica da neoplasia [56]. Um estudo de Schiller e colaboradores, com 488 pacientes, dos quais 197 realizaram análise do KRAS, encontrou 24% de mutações. Os indivíduos com KRAS selvagem apresentaram uma média de sobrevida de 42 meses comparados com apenas 25 meses nos pacientes que carregavam a mutação. Entretanto, após análise multivariável, a presença de mutação no KRAS não foi considerada como um fator prognóstico de forma independente.

Finalmente, as mutações do gene KRAS têm sido investigadas como preditores de resposta ao tratamento de pacientes com câncer de pulmão. Uma metanálise de Loriot et al sugere fortemente que as mutações no KRAS não têm valor e não deveriam ser utilizadas como um preditor molecular de resposta à terapia convencional para os pacientes com câncer de pulmão, ou outros tumores sólidos. Por outro lado, vários outros estudos mostram achados opostos em pacientes tratados com inibidores de tirosina quinase, pois a presença de mutação no KRAS tem sido considerada um marcador desfavorável às drogas gefitinibe ou erlotinibe [57][35].

### 3.7.3 Gene EML4-ALK

A fusão do gene EML4, echineoderm microtubule-associated protein-like, e ALK, anaplastic lymphoma kinase, ambos presentes no braço curto do cromossomo 2, foram invertidos para gerar a fusão EML4-ALK. Esta fusão foi primeiramente identificada em linfoma anaplásico de grandes células que mostrou potente atividade oncogênica, tanto in vitro como in vivo, em diversos tumores [14].

Vários estudos têm avaliado a frequência da fusão EML4-ALK em pacientes com NSCLC. Primeiramente, Soda et al avaliou 75 pacientes japoneses encontrando uma frequência de 6,7% para a fusão EML4-ALK naquela população. Um estudo de Martelli, em uma amostra de pacientes com NSCLC não-asiáticos, relatou uma frequência de 7,5%, aparentemente não havendo diferenças na proporção entre a população ocidental [58][59].

Assim, uma sequência de outros estudos foram realizados, encontrando uma média de 3 a 13% dos pacientes com NSCLC que carregam a fusão deste gene. Obviamente, estas proporções de alterações no EML4-ALK são bem menos frequentes se compararmos com as mutações no gene do EGFR ou do KRAS. No entanto, se considerarmos apenas 5% de todos os pacientes com NSCLC que contêm a fusão genética EML4-ALK, estes valores equivaleriam a 70.000 pacientes diagnosticados anualmente em todo o mundo [35].

Em relação às características clínicas dos pacientes que carregam esta fusão do gene EML4-ALK, elas tendem a ocorrer em indivíduos que dividem algumas similaridades com os pacientes que apresentam a mutação do EGFR. Apesar de alguns dados demográficos dos pacientes que carregam a

mutação do EGFR e a fusão EML4-ALK serem semelhantes, alguns estudos consideram que a presença de mutação e da fusão são mutuamente exclusivas [60].

Observou-se que a fusão dos genes EML4-ALK ocorre mais em pacientes jovens e com a presença de doença em estágios avançados. Além disso, mostrou ser mais frequentemente encontrada em pacientes não-tabagistas, comparados aos que fumam.

Em relação à histologia, esta mutação, assim como o EGFR e KRAS, mostrou ser mais presente nos adenocarcinomas com características acinares, em células em anel de sinete e com produção de mucina. O modelo acinar foi mais frequente na população asiática, enquanto que a histologia em anel de sinete foi mais prevalente na população ocidental.

Apenas poucos estudos relataram a presença de EML4-ALK em pacientes com carcinomas epidermóides, porém com frequências muito mais baixas [56][58].

#### **3.7.4 Gene Supressor Tumoral P53**

O p53 é um importante gene supressor tumoral que induz à morte celular e à supressão de metástases em resposta a vários tipos de agentes estressores para as células, como dano ao DNA, hipóxia, entre outros. É altamente frequente ocorrendo, de modo geral, em 23 a 65% das neoplasias pulmonares. Esta mutação é considerada altamente estável, sendo mais frequente nos exons 5-8. Elas ocorrem relativamente na fase precoce do desenvolvimento das neoplasias pulmonares e são, potencialmente, necessárias para manter

a evolução do processo maligno. Na maioria das vezes, estas mutações são preservadas durante a progressão e o desenvolvimento das metástases [35].

As frequências das mutações do gene p53 são mais altas em subtipos histológicos que estão mais consistentemente associados a pacientes tabagistas, especialmente, em carcinomas de pequenas células e nos epidermóides. Em adenocarcinomas, a frequência desta mutação é menor, já que a associação com o tabagismo neste tipo histológico não é tão proeminente como nos demais grupos. Podem ser encontradas mais mutações do p53 em histologias mistas de adenocarcinomas. Porém, estas mutações em carcinomas bronquioloalveolares são relativamente raras. Alguns estudos mostram que esta mutação poderia estar associada à presença de mutação do KRAS [9][14].

A significância prognóstica da presença de mutação no gene p53, em neoplasias pulmonares, não está inteiramente esclarecida. No entanto, a maioria dos estudos clínicos, os tumores que carregam esta mutação, conduzem a um pior prognóstico em alguns tipos histológicos. Uma metanálise de Mitsuomi et al demonstrou que o gene p53 é um significativo marcador de mau prognóstico em adenocarcinomas e, além disso, os pacientes se mostraram mais resistentes ao tratamento quimioterápico que aqueles que não carregavam esta mutação. Por outro lado, em pacientes com histologias epidermóides, esta mutação não se mostrou ser um indicador de mau prognóstico, sugerindo que o p53 possa ter diferentes papéis na progressão destes dois diferentes tumores [61].

### 3.8 Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP) e seus Receptores

A bombesina é um tetradecapeptídeo com ação biológica e foi isolada, em 1971, por Anastasi et al da pele do anfíbio *Bombina bombina*. Mais tarde, foram isolados outros peptídeos análogos à bombesina (BLP) em mamíferos, sendo que os mais conhecidos foram o peptídeo liberador de gastrina (GRP), a neuromedina B (NMB) e o subtipo 3 (BB3). Exceto o receptor de GRP, os outros três subtipos têm sido pobremente caracterizados até o momento, considerando a função e a distribuição em tecidos humanos [62].

Estes receptores dividem 50% de homologia entre si e são, na maioria das vezes, armazenados em vesículas intracelulares e liberados dentro do fluido extracelular, quando estes grânulos sofrem exocitose. Após a secreção, estes peptídeos difundem-se e interagem com o meio, ativando os seus específicos receptores de membrana. Todos eles são acoplados à proteína G, via domínio intracelular e, assim, fazem a transdução de sinal através da fosfolipase C. Estes receptores, portanto, pertencem à superfamília de receptores da proteína G [63].

O principal BLP é o peptídeo liberador da gastrina, isolado primeiramente de tecidos gástricos suínos. Ele teve sua primeira atividade conhecida devido à indução da secreção de gastrina a partir das células G do antro gástrico.

O GRP possui 27 aminoácidos e compartilha com a bombesina uma sequência de 7 aminoácidos C-terminal, o que é essencial para a imunogenicidade e para uma ligação de alta afinidade ao receptor do GRP (GRPR). Desta maneira, o GRP e a bombesina apresentam essencialmente efeitos fi-

siológicos idênticos [64].

- **Bombesina:** *Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>*
- **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-NH<sub>2</sub>*

Nos seres humanos, o GRPR é codificado por um gene que está localizado no cromossomo Xp22 e apresenta 384 aminoácidos. Este peptídeo e seu receptor são largamente distribuídos no tecido nervoso central de mamíferos, incluindo hipotálamo, trato gastrointestinal, pulmão e trato urogenital. Eles apresentam amplo espectro de respostas biológicas, tanto com funções fisiológicas, quanto fisiopatológicas. No sistema digestivo e urogenital, o GRP media uma série de respostas celulares que incluem a modulação do músculo liso, a secreção de ácido gástrico, a secreção de enzimas pancreáticas e a liberação de gastrina, somatostatina e outros hormônios gastrointestinais [65][66].

Os efeitos neurais dos BLPs incluem alterações do comportamento animal como a supressão da ingestão alimentar e a melhora do aprendizado em modelos animais. Estudos em ratos demonstraram que a deprivação de alimento e a estimulação do sistema melanocortina, que está envolvido na regulação da fome, produziram alterações opostas na expressão do gene do GRP no núcleo paraventricular. Estes achados sugerem que o GRP, presente no hipotálamo, pode fazer parte dos caminhos de sinalização que controlam a ingestão alimentar e o balanço energético. Outros efeitos observados do

GRP no SNC foram a regulação do ritmo circadiano, as respostas ao medo e à ansiedade, além da termorregulação [66].

Investigações recentes têm demonstrado várias outras novas funções deste receptor, pois observou-se a sua presença na medula espinhal. Estudos mostram que a expressão do GRPR em neurônios da medula seria responsável, em parte, por mediar a sensação de prurido. Estudo em ratos, através da inibição farmacológica com antagonistas do GRPR, houve diminuição significativa de prurido nos animais, que foram expostos a estímulos deste tipo [67].

Além disso, outros novos trabalhos indicaram que a expressão do GRPR em gânglios sacrais poderia estar envolvido diretamente no reflexo peniano. Um trabalho de Sakamoto et al demonstrou a presença de receptores de GRP no sistema de neurônios e axônios da medula espinhal que inervam a região conhecida por controlar a ereção e a ejaculação. Além disso, este mesmo autor identificou que a expressão de GRPR dentro deste sistema, na medula espinhal, é muito mais proeminente em homens comparados com as mulheres. Tais achados poderiam oferecer uma nova alternativa em termos de opções terapêuticas na disfunção sexual masculina [68].

### **3.8.1 GRPR como um Receptor Acoplado à Proteína G**

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) são a maior família de moléculas de superfície celular envolvidas na transmissão de sinais intracelulares. Recentemente, estes receptores têm recebido maior atenção dos pesquisadores, pois se observou que desempenham um papel crucial no cres-



cimento tumoral e na indução de metástases. Este grupo de receptores, que são representados por mais de 800 membros, são responsáveis por múltiplas funções biológicas de diferenciação e reparo celular, além de fazer parte dos processos de inflamação e angiogênese [69].

Muitos dos GPCR são superexpressos em diversos tipos de câncer, tendo crucial papel no desenvolvimento de tumores agressivos como neoplasias pulmonares, de cabeça e pescoço, pancreáticos, etc. Embora muitos destes tumores apresentem diversas mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, o crescimento e a sobrevivência das células tumorais são altamente dependentes da ativação dos GPCR [70].

O GRPR faz parte desta grande família dos GPCR, pois é um fator de crescimento autócrino e mitogênico em células tumorais. A maioria dos mecanismos, através dos quais o GRP afeta a progressão dos tumores, não está completamente compreendida. No entanto, recentes estudos tentam elucidar quais as vias pelas quais o GRP/GRPR influencia o crescimento celular das células tumorais. Através da ligação do GRP no seu receptor GRPR, vários outros caminhos de sinalização intracelulares são ativados [65]. Estes incluem a fosfolipase A, B e D, o AMPc, o PKC e a cascata das quinases como Raf, MEK, ERK, resultando num aumento da expressão de ativadores da proliferação celular como o c-myc e o c-jun. Além destes, há evidências de que o GRP transmite estímulos para a ativação de outras importantes proteínas intracelulares, como a família da tirosino-quinase, a Src quinase e os receptores de EGF [71][72].

A fosforilação do EGFR, através da ativação do GRPR, foi previamente relatada como resultado da proliferação de neoplasias de próstata, de cabeça e

pescoço e de pulmão [73][72][74]. Tem sido proposto que o GRPR, acoplado à proteína G, induz a ativação da família das metaloproteases que, por sua vez, provoca a fosforilação do EGFR. Estes caminhos de sinalização, foram bem descritos em um estudo de Sufi et al. A autora demonstrou, pela primeira vez, em linhagens celulares de carcinomas não-pequenas células de pulmão, que o estímulo dos receptores de GRP poderiam mediar a ativação de EGFR. Isto resultaria na ativação da MAPK, uma importante proteína que desencadeia respostas complexas na proliferação celular [75].

Na figura abaixo a representação das interações entre o EGFR e o GRPR (Adaptado de Fisher et al [76]).

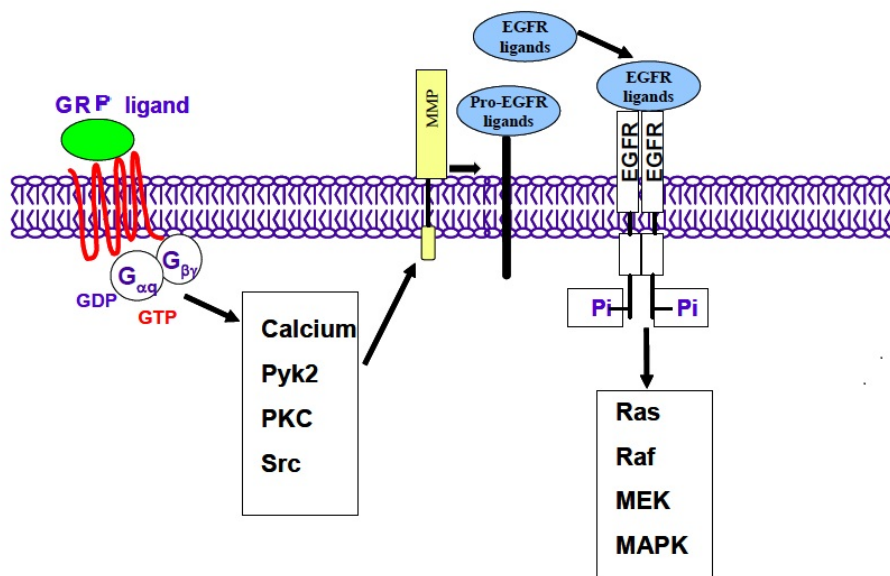


Figura 4: Sinalização entre o EGFR e o GRPR

Estudos demonstraram que em linhagens celulares deficientes de EGFR, o GRP falhou em ativar o MAPK, indicando que este processo primariamente

ocorre através do EGFR em NSCLC. Este mesmo autor demonstrou que, após utilização da combinação de antagonistas de EGFR e de GRPR em linhagens de NSCLC, resultou em efeitos citotóxicos antitumorais aditivos, ou seja, houve uma maior destruição celular do que se ambos fossem utilizados separadamente. Assim se chega à conclusão de que os antagonistas de GRPR poderiam ser utilizados como agonistas dos inibidores de EGFR. O objetivo seria melhorar a eficácia clínica e, além disso, diminuir os níveis séricos das drogas inibidoras de EGFR para se obter um mesmo grau de citotoxicidade celular [73].

Koppan et al também comprovou vias de sinalização entre o GRPR e o EGFR. Em seu estudo, utilizou antagonistas sintéticos de GRPR em camundongos com câncer de pulmão induzidos. Através disso, observou marcada supressão tumoral com uma diminuição importante do crescimento dos tumores. Após a análise dos tumores remanescentes, constatou, através da concentração RNAm, uma diminuição importante nos níveis de receptores de membrana, tanto de GRPR quanto de EGFR. Estes dados corroboram, mais uma vez, que há possivelmente um efeito sinérgico intracelular entre estes dois importantes receptores de membrana [77].

O grupo de estudos de Grandis, dedicado à pesquisa de neoplasias de cabeça e pescoço, demonstrou que ambos GRPR e EGFR coexistem e interagem para estimular a proliferação celular naquelas neoplasias. Linhagens celulares destes tumores expressam altos níveis tanto de EGFR, quanto de GRPR. Em seus trabalhos, ela observou que o GRP induziu a rápida fosforilação de EGFR e também a ativação de p44/42-MAPK. Em linhagens celulares deficientes de EGFR, os estímulos produzidos pelo GRP falharam

em estimular a proliferação celular. Isto indica que os efeitos mitogênicos do GRP requerem a ativação e são dependentes críticos do EGFR, para a transmissão dos sinais mitogênicos em neoplasias de cabeça e pescoço.

A família da Src quinase tem sido investigada como outro caminho de ligação entre o EGFR e o GRPR na ativação intracelular. Esta proteína quinase desempenha um papel chave na regulação da transdução de sinal, desde os receptores de membrana até o núcleo da célula. O estudo de Zhang et al demonstrou que o GRP é capaz de induzir a ativação da família da Src quinase, pois normalmente está ativada de forma direta no interior da células, através do EGFR. Neste trabalho de Zhang, o GRP foi capaz de ativar a Src, tanto em células com presença de EGFR quanto em células com ausência deste receptor. No entanto, em linhagens celulares nas quais o EGFR apresentava-se deficiente, a ativação do Src pelo GRP foi menor. Este estudo concluiu que a presença de EGFR é necessária para a máxima ativação do Src através do GRP [78][79].

Em 2007, o mesmo grupo de Grandis et al demonstrou o aumentado do efeito antitumoral com antagonistas de EGFR (erlotinibe), quando foi utilizado com um antagonista do GRPR (PD176252) em neoplasias de cabeça e pescoço. Foram encontradas quantidades diminuídas de fosfo-EGFR, fosfo-MAPK e fosfo-c-Jun, quando as duas drogas foram utilizadas em combinação. O referido trabalho demonstrou que a adição de um inibidor de GRPR pode bloquear ambos os caminhos de ligação intracelular, tanto dependentes quanto independentes de EGFR. Além disso, a combinação das drogas inibiu significativamente a invasão e a viabilidade celular, resultando em aumentada apoptose e em alterações no ciclo celular, como redução da

fase S e parada do ciclo celular na fase G1.

Tais estudos sugerem fortemente, mais uma vez, que a combinação das drogas poderia melhorar os resultados clínicos de pacientes com neoplasias que expressam níveis elevados de EGFR e de GRPR como por exemplo, em pacientes com neoplasias pulmonares e de cabeça e pescoço [71][80].

### **3.8.2 Peptídeo Liberador de Gastrina e Câncer**

A expressão aumentada de receptores de fatores de crescimento em células malignas é normalmente um marcador de um tumor biologicamente agressivo e, geralmente, está associado a um prognóstico reservado. Estes receptores estão ativamente envolvidos na inibição da apoptose, ocasionando a proliferação celular, a angiogênese, a invasão local e a maior frequência de metástases à distância. Muitas evidências têm sido relatadas sobre a importância do GRP e seus receptores, como um fator de crescimento, desenvolvimento e progressão da carcinogênese em diversos tumores [65].

A associação direta de GRP com câncer foi demonstrada por Cutita et al em 1985. Em seu estudo, utilizou um anticorpo para bombesina, que se ligou à porção C terminal do GRP, ocasionando inibição do crescimento celular de SCLC, tanto in vitro quanto in vivo. Ele teorizou que as células produzem e secretam substâncias similares a hormônios que podem interagir com receptores de membrana específicos na superfície celular, induzindo efeitos como a proliferação e o crescimento celular. Estes resultados demonstram que os peptídeos liberadores da gastrina poderiam funcionar como fatores de crescimento autócrino nas células tumorais. Por isso, quando este peptídeo está

muito superexpresso, a ligação do GRP com seu receptor, com alta afinidade, funciona como um mecanismo de estímulo autócrino e parácrino em células neoplásicas, estimulando a proliferação celular [81].

O GRPR está superexpresso em diferentes linhagens de tumores, no entanto, a distribuição nos tecidos normais é muito baixa ou quase nula [82]. Uma série de estudos clínicos e experimentais demonstraram que a expressão aumentada destes receptores se correlacionou com o maior crescimento e com um maior potencial metastático na maioria das neoplasias que carregavam este receptor. Por isso, o interesse pelo GRPR vem crescendo e expressões aberrantes deste peptídeo têm sido observadas em uma variedade de neoplasias humanas como de próstata, de mama, de pâncreas, de esôfago, de cólon, carcinóides do trato gastrointestinal, de pulmão, de cabeça e pescoço e neoplasias cerebrais [65][66][83].

Em neoplasias de cólon, a expressão de GRP e seu receptor têm sido extensivamente estudada. Alguns trabalhos, com poucos pacientes, demonstraram que a expressão de GRPR em pacientes com este tipo de tumor podem variar de 24 a 40%. Carroll et al demonstrou que os receptores de GRP não são normalmente expressos pelas células epiteliais do cólon normal. Estes receptores estariam presentes apenas durante o desenvolvimento embrionário, pois este receptor contribuiria para o crescimento e o desenvolvimento das vilosidades. No seu trabalho, com 50 pacientes com neoplasia de cólon, 84% dos doentes expressaram este receptor de forma intensa, sendo que os tumores mais bem diferenciados apresentaram maior expressão deste receptor. No entanto, a expressão do GRPR foi observada com igual frequência nos diferentes estágios clínicos, e, interessante, esteve ausente na maioria

das metástases produzidas por estes tumores. Este estudo não demonstrou haver correlação entre a expressão deste receptor e a sobrevida dos pacientes [84][85].

Rivera et al estudou uma coorte de 197 pacientes com neoplasias de cólon em estágios clínicos II e III. Nestes, analisou a expressão de GRPR em relação à sobrevida livre de progressão. O autor demonstrou que os pacientes cujos tumores que mais expressaram GRPR tiveram uma sobrevida maior em relação aos pacientes que tiveram menor expressão deste receptor ( $p=0,05$ ). No referido estudo, ao contrário do anterior, os pacientes cujos tumores tiveram maior expressão de GRPR apresentaram melhor sobrevida, embora os dados não tenham sido estatisticamente significativos. Tais estudos sustentam a idéia de que o GRP também seja um fator de crescimento em neoplasias de cólon, porém, este receptor parece agir de forma diferente em neoplasias de cólon comparadas com os outros tumores [86].

Assim como em neoplasias de cólon, o GRPR tem sido investigado em neoplasias de próstata. Este receptor foi detectado inicialmente em linhagens celulares androgênio-independentes e em espécimes cirúrgicas desta neoplasia [87]. Vários outros trabalhos têm sugerido que o GRP e seu receptor são grandes responsáveis pela progressão tumoral e pelo mau prognóstico de pacientes com câncer de próstata androgênio-independente. Na pesquisa de Constantino et al, que avaliou a expressão de GRPR através de imuno-histoquímica, encontrou a presença deste receptor em 60% dos trinta pacientes estudados. A expressão do GRPR foi mais pronunciada em adenocarcinomas moderadamente diferenciados, enquanto que os pobremente diferenciados pouco expressaram este marcador. Além disso, a expressão de GRPR esteve também

correlacionada com a recidiva da doença, pois 100% dos pacientes que apresentaram recorrência da doença tiveram altos índices deste receptor. Estas evidências sugerem que, em neoplasias de próstata, o GRPR está relacionado com a agressividade da doença [88][89].

A maioria dos carcinomas mamários expressam receptores de GRP, sendo que estes têm se mostrado ausentes nas células epiteliais de tecido mamário normal. Inicialmente, Guggenberger et al iniciou as pesquisas com este biomarcador em câncer de mama, observando alta densidade na distribuição do GRPR nas células mamárias neoplásicas. Em seu trabalho, observou a presença de 62% de GRPR em carcinomas ductais invasivos e em 64% dos tumores in situ, num total de 63 pacientes examinados. Além disso, as metástases em linfonodos mantiveram a mesma expressão de GRPR assim como os tumores primários que deram origem àquelas metástases. Este estudo sugere que a expressão de GRPR é praticamente a mesma nos diferentes graus tumorais das células neoplásicas mamárias [90][65]. Estudos posteriores confirmaram a mesma incidência dos receptores de GRP em amostras de tecido neoplásico mamário, com praticamente a mesma distribuição e homogeneidade entre o tumor primário e as metástases axilares. Portanto, todos estes trabalhos sugerem que o GRPR poderia, assim como os receptores de estrogênio e de progesterona, regular a proliferação e diferenciação das células mamárias [91].

Apenas muito recentemente, tem sido investigada a presença dos receptores de bombesina em neoplasias do sistema nervoso central, em especial nos gliomas. Flores et al avaliou a frequência de GRPR em diferentes graus de astrocitomas em humanos através da técnica de imuno-histoquímica. A presença de GRPR foi detectada em 100% das amostras de 34 casos de astro-



citomas, não apresentando correlação com o grau do tumor ou com a curva de sobrevida dos pacientes estudados [92]. Em neuroblastomas, o GRPR se mostrou ter, além das estabelecidas funções mitogênicas, também propriedades oncogênicas importantes. Este receptor é também largamente expresso em neuroblastomas indiferenciados e agressivos. Em modelos animais desta neoplasia, as células deficientes de GRPR tiveram um atraso no crescimento, e produziram menos metástases hepáticas que as demais que apresentaram alta expressão deste marcador. Além disso, nestes tumores, o GRPR mostrou atividades angiogênicas, pois induziu a expressão de marcadores como a molécula de adesão endotelial (PECAM-1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [93].

Em neoplasias de cabeça e pescoço, Lango et al investigou a expressão de GRP na mucosa normal e em tecido tumoral. Foram avaliados 25 pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço, 6 controles e 14 linhagens celulares desta mesma neoplasia. Tanto os tumores, quanto a mucosa adjacente, expressaram de quatro a seis vezes maiores quantidades de RNAm de GRPR do que em mucosas de pacientes sem neoplasia ( $p < 0,01$ ). Além disso, os mais altos níveis de expressão de GRPR foram intimamente associados com a presença de metástases em linfonodos e de invasão extracapsular do tumor. Estes trabalhos foram confirmados *in vitro*, e os resultados mostraram que a expressão de GRPR era muito mais proeminente nas células tumorais do que em células epiteliais de mucosa normal [94].

Estes estudos sugerem que a expressão aumentada de GRPR, na mucosa adjacente ao tumor, pode ser considerada como um evento precoce na formação da neoplasia. Outros estudos corroboraram estes achados e acrescentam

outras importantes informações. A expressão aumentada de GRPR, nos tumores de cabeça e pescoço, esteve altamente correlacionada com a expressão de EGFR e de TGF-alfa, sendo estas associações estatisticamente significativas ( $p < 0,0026$ ). O EGFR e o GRPR são altamente expressos nestes tumores, e ambos, estes fatores de crescimento coexistem e interagem para estimular a proliferação celular nestas neoplasias. O EGFR parece ser crítico em transmitir os sinais mitogênicos do GRP [65][78].

### **3.8.3 Antagonistas do GRPR**

Novas abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas, baseadas nos recentes avanços e na compreensão do papel dos fatores de crescimento e dos neuropeptídeos na progressão das neoplasias. Por isso, têm se desenvolvido antagonistas sintéticos do receptor de GRP como, por exemplo, o RC3095 e o RC 3940. Eles foram produzidos com a finalidade de se ligarem com alta afinidade ao receptor, bloqueando, conseqüentemente, os caminhos de sinalização intracelular [?]. Os mecanismos de inibição das células antitumorais, através dos antagonistas do GRP, parecem ser mais complexos do que um simples bloqueio do receptor. Todas as vias de sinalização que serão bloqueadas com os antagonistas do GRPR não estão totalmente compreendidas. Os estudos mostraram que há redução dos níveis da família de receptores do HER que incluem o EGFR, o HER-2 e o HER-3. Além disso, ocorre a atenuação da expressão dos oncogenes c-fos, c-jun, K-RAS e as proteínas quinase que incluem MAPK e PKC. Há evidências de que os antagonistas de GRPR alteram de fatores de crescimento cruciais da angiogênese como o VEGF e

o FGF e, além disso, modulam os genes supressores tumorais como o p53 [77][95][96].

Stangelberger et al demonstrou, em modelos pré-clínicos, que em linhagens celulares de câncer de próstata androgênio-independente, o RC3940 produziu uma inibição do crescimento celular *in vitro* e em modelos animais. A combinação de antagonistas de GRP e de antagonistas de GHRH potencializou os efeitos inibitórios em neoplasias de próstata. Estes mostraram ser efetivos na redução da frequência de lesões osteolíticas e de fraturas patológicas destes tumores, quando implantados intra-ósseos [97].

O RC3095 e o RC 3940 foram utilizados em linhagens celulares de carcinomas mamários estrogênio independentes, resultando em significativa redução do crescimento celular. Estes resultados são animadores, pois na prática clínica, as modalidades terapêuticas para carcinomas mamários, que não apresentam receptores de estrogênio e de progesterona, não são muito efetivas e, ainda, são consideradas neoplasias muito agressivas [98].

Outros achados relevantes de Bajo et al foi a redução importante do crescimento de neoplasias de mama em camundongos, quando se utilizou antagonistas do GRPR. Além do mais, houve uma diminuição significativa dos níveis de RNAm e da expressão proteica, através dos estudos de imunohistoquímica, de VEGF, de FGF e de IGF. Outros recentes relatos demonstraram que tanto o antagonista RC3095 quanto o RC3940, além de inibirem o crescimento celular, produziram supressão do ErB-2/HER-2, importante receptor em câncer de mama. Estes estudos mostram que os efeitos inibitórios dos antagonistas do GRPR parecem estar envolvidos em vários e complexos mecanismos de sinalização intracelular [99][95].

Nas neoplasias pulmonares, alguns antagonistas de GRPR foram utilizados, observando-se inibição do crescimento tumoral. Koppan et al comparou os antagonistas RC3095 e o RC3940 tanto *in vitro*, em linhagens celulares de carcinoma de pequenas células, quanto *in vivo*, em camundongos transplantados com células do mesmo tumor. Os resultados mostraram que o RC 3940 apresentou maior atividade antitumoral *in vivo* do que o RC3095. A supressão do crescimento tumoral induzida por ambos os antagonistas foi acompanhada por marcada redução dos receptores de EGF e dos níveis de RNAm de EGFR. Estes resultados confirmaram o estudo de Halmos et al que após utilizar o antagonista RC3095 em SCLC resultou na diminuição do número de receptores, tanto de GRP quanto de EGF [77][100][101].

Assim como mencionado em capítulos anteriores deste trabalho, em neoplasias pulmonares, tanto em histologias de pequenas quanto em não-pequenas células, a inibição do crescimento celular foi muito mais pronunciada, quando os antagonistas do GRPR foram utilizados de forma combinada com os inibidores de tirosina quinase do EGFR (gefitinibe ou erlotinibe). Houve uma potencialização da inibição do crescimento celular, assim como uma diminuição da expressão tanto de GRPR quanto de EGFR. Estes mesmos achados foram observados em vários trabalhos, tanto em carcinomas pulmonares quanto nos de cabeça e pescoço que expressam altos níveis de EGFR [73].

Estudo de Fase I, com o antagonista RC3095, foi conduzido por Schwartzmann et al que utilizou uma amostra de 25 pacientes com as mais diversas neoplasias avançadas e refratárias aos tratamentos anteriores. Neste estudo, não foram relatadas respostas objetivas dos pacientes incluídos. No entanto, houve evidência de um efeito antitumoral em um paciente com carcinoma me-

dular de tireóide em lesão metastática em linfonodo supraclaviculares, não alcançando, portanto, critérios para resposta objetiva. É importante relatar que em todos os pacientes que fizeram uso do RC3095 deste estudo, não houve registros de toxicidade sistêmica. Foram observados apenas desconforto no local da aplicação da droga [102].

#### **3.8.4 Peptídeo Liberador de Gastrina no Desenvolvimento Pulmonar e na Transformação Neoplásica**

Há crescentes evidências de que os peptídeos ligados à bombesina, principalmente o GRP, são importantes fatores de crescimento do epitélio pulmonar normal. Emanuel et al demonstrou em modelos animais e em humanos, que este peptídeo promove o crescimento e a maturação de pulmões fetais, durante o período gestacional. Além disso, observou-se que o GRP, juntamente com seu receptor, estão envolvidos na proliferação mesenquimal e epitelial pulmonar, na diferenciação dos alvéolos tipo II e, principalmente, na produção de surfactante [103][104][105].

Estudos envolvendo GRP em neoplasias pulmonares foram iniciados na década de 80. Cuttita e seus colaboradores utilizaram em seus experimentos anticorpos que, ao se ligarem a região C-terminal do receptor de GRP, produziram inibição do crescimento de linhagens de SCLC, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Eles concluíram que este peptídeo poderia ser um fator importante no crescimento e na progressão do câncer de pulmão [81]. Outros autores confirmaram os estudos de Cuttita, sugerindo ainda que este análogo da bombesina é claramente considerado um fator de crescimento autócrino,

ou seja, é capaz de produzir fatores endógenos para a sua auto-estimulação. A partir de então, vários autores demonstraram, em linhagens celulares, que o GRP é capaz de estimular a proliferação de linhagens tumorais de células pulmonares [106].

Inicialmente, Moody et al observou que os receptores de bombesina estão presentes em carcinomas neuroendócrinos de pequenas células em todas as linhagens celulares de SCLC, mas não em outras histologias de câncer de pulmão [107]. No entanto, um estudo de Yamaguchi et al investigou este receptor em 131 tecidos de neoplasias pulmonares, demonstrando que não apenas os SCLC expressavam GRPR, mas também as outras histologias, entretanto em quantidades menores de receptores [108]. Para corroborar este achado de que as neoplasias não-pequenas células são capazes de produzir peptídeos neuroendócrinos, mais estudos identificaram outros hormônios peptídeos nestas histologias. Anteriormente estes eram considerados exclusivos de SCLC como a calcitonina, os hormônios adrenocorticotróficos, a vasopressina entre outros [109][110].

Estas pesquisas serviram de base para que outras hipóteses fossem criadas a respeito da origem das neoplasias pulmonares, pois estas poderiam ser diferenciadas de uma linhagem comum, já que o peptídeo estaria presente em ambos os grupos de histologias pulmonares. Várias linhas de evidências sugerem que uma célula tronco multipotente seria capaz de se diferenciar em células neuroendócrinas maduras, e outras, em células ciliadas [111]. Isso explicaria por que alguns tumores contêm componentes neuroendócrinos como o GRP, tanto em SCLC, quanto em NSCLC. Além do mais, alguns trabalhos mostraram que em até 15% das neoplasias não-pequenas células apresentam

características neuroendócrinas. As similaridades nas histologias e os divididos fenótipos, entre os carcinomas de pequenas células e os de não-pequenas células, sustentam a hipótese de que o GRP possa ser um importante componente responsável pelo crescimento e pelo desenvolvimento de todos os grupos de tumores pulmonares [112].

Estudo de Sunday et al demonstrou, através de análise de expressão genética do GRP, com 176 pacientes, que o RNAm esteve presente tanto em SCLC, quanto em NSCLC. Estes resultados também sugerem que os subtipos histológicos de tumores pulmonares podem ser derivados de um progenitor comum de células. Esta teoria da histogênese não é restrita aos tumores pulmonares, pois tem sido descrita em outros tecidos epiteliais, como nas neoplasias de cólon [113].

Cada vez mais evidências demonstram que os peptídeos análogos da bombesina podem estar envolvidos nos estágios mais precoces da carcinogênese brônquica em humanos. Um estudo de Andrea et al demonstrou que células epiteliais brônquicas humanas expressaram baixos níveis de GRPR, e, mesmo após o estímulo com a bombesina, não foi suficiente para desencadear a liberação de cálcio intracelular, não tendo, portanto, qualquer sinal de crescimento celular [114][114]. Por outro lado, em amostras de tecido neoplásico pulmonar e de doenças pulmonares obstrutivas crônicas severas, cujo epitélio brônquico apresentava importantes alterações patológicas das glândulas, houve resposta importante ao estímulo da bombesina. Estes resultados corroboram a hipótese de que a responsividade à bombesina é adquirida durante os múltiplos estágios da carcinogênese da mucosa brônquica em humanos [10] [115].

Vários trabalhos também têm investigado a expressão de GRPR em tecido pulmonar não neoplásico de pacientes tabagistas e não tabagistas. Os resultados mostraram que, em indivíduos que fumam, vários peptídeos neuroendócrinos, principalmente o GRP, não estão apenas aumentados em número, mas inclusive são secretados em maior quantidade. O estudo de Aguayo relatou que pacientes assintomáticos mas tabagistas, sem qualquer doença pulmonar clinicamente detectável, exibem aumentados níveis de GRP nos fluidos de lavagem broncoalveolar, quando comparados com pacientes não tabagistas [116][117].

Outro estudo observou que, através de estímulos com nicotina e nitrosaminas, em modelos animais, ocorreu um aumento do número de células neuroendócrinas. É possível que as substâncias presentes no cigarro possam causar uma hiperplasia destas células. Os mesmos achados podem ser encontrados em indivíduos que vivem em altas altitudes, sugerindo que poderia haver uma resposta adaptativa à hipoxia crônica, e o GRP, por consequência, seria um contribuinte para o processo de reparação tecidual [117]. Foi observado também, níveis bastante alterados deste peptídeo em pacientes com doenças pulmonares como bronquiectasias, doença pulmonar obstrutiva crônica e asbestose. A presença precoce deste peptídeo, nestas alterações pulmonares, apóia a hipótese de que a hiperplasia destas células neuroendócrinas poderia exercer importante papel nas doenças pulmonares, inclusive na indução e no desenvolvimento de neoplasia [114]

Importantes evidências sugerem que há marcadas diferenças no desenvolvimento das neoplasias pulmonares entre homens e mulheres. Estas podem ser, em grande parte, relacionadas à presença de desiguais concentrações de



GRPR nos diferentes sexos. O gene do GRPR está localizado no cromossomo sexual Xp22; portanto, as mulheres teriam dois alelos ativamente transcritos do GRPR, comparados apenas com um alelo nos homens [10]. Teoricamente, as mulheres teriam maior expressão deste receptor, portanto poderiam ter um aumento na suscetibilidade para desenvolvimento de câncer de pulmão. Um estudo de Shriver et al demonstrou que a expressão por RNAm esteve presente em 55% das mulheres e, em 0% dos homens não tabagistas. No grupo de tabagistas, que fumavam a mesma quantidade de cigarros, o GRPR foi encontrado em 75% das mulheres, comparados com apenas 20% nos homens. Estes dados mostram que, além de o GRPR ser mais frequentemente expresso em mulheres, na ausência de tabagismo, ele é ativado mais precocemente nestas, como resposta a este agente estressor [117][11].

Além do mais, este mesmo autor demonstrou que, em linhagens celulares de via aérea, houve aumento na expressão do GRPR quando expostas a estrogênio. Estes estudos podem nos sugerir que o GRPR teria uma ação biológica maior em mulheres por ser em parte regulado por hormônios femininos [118].

### **3.8.5 Pró-GRP**

Mais recentemente, tem sido investigada a importância do peptídeo liberador de pró-gastrina (Pró-GRP), como um biomarcador em pacientes com neoplasias pulmonares, principalmente em SCLC. Myake et al demonstrou que o Pró-GRP é um precursor do GRP e tem sido considerado por alguns autores um específico e confiável marcador para as neoplasias de pequenas

células [119].

O Pró-GRP é uma molécula estável nos meios circulantes e pode ser detectada nos níveis sanguíneos. O GRP, no entanto, apresenta meia-vida muito curta, cerca de 2 min e, por tais razões, este não poderia ser utilizado em análise clínica. Atualmente, é bem aceito que o Pró-GRP é mais sensível e específico para SCLC do que outros marcadores tumorais, como a enolase neurônio específica (NSE). Um estudo de Sunaga investigou a utilidade do Pró-GRP como um marcador para diagnóstico e tratamento de pacientes com carcinomas pulmonares. Ele encontrou que a especificidade deste marcador foi de 93,7%, e da NSE foi de 65%. Em relação aos subtipos histológicos, este mesmo autor encontrou níveis positivos de Pró-GRP em 75% dos SCLC, 9,7% em adenocarcinomas, 5,6% em carcinomas epidermóides e 0% nos carcinomas de grandes células [120][121][122].

Além disso, o Pró-GRP se mostrou um útil marcador molecular para avaliação da extensão da doença em pacientes com SCLC. Estudo de Hirose demonstrou que 75-90% dos pacientes com doença extensa e 60-70% dos que apresentaram doença limitada tiveram níveis séricos aumentados de GRP. Este marcador foi mais sensível que o NSE para esta finalidade, que mostrou 60-70% para doença extensa e 40-60% para doença limitada.

Vários trabalhos também relataram que o Pró-GRP tem se mostrado elevado em pacientes que apresentam recidiva da doença, porém, estes dados ainda são muito conflitantes. Cerca de 74 a 94% dos pacientes apresentam níveis elevados de Pró-GRP quando havia recidiva da neoplasia. Estes marcadores têm grande utilidade, não apenas porque indicam precocemente a recidiva tumoral, mas também, porque pode-se iniciar precocemente o tra-

tamento. No entanto, em estudo retrospectivo de Hirose não confirmou os mesmos achados, demonstrando que o Pró-GRP não é um marcador útil para detectar recidivas mais precocemente do que sintomas clínicos, ou os achados radiológicos em pacientes com SCLC [123].

O Pró-GRP tem sido mais estudado em SCLC, no entanto, os níveis anormais são encontrados também em NSCLC. Numa amostra de 187 pacientes com NSCLC, os níveis de Pró-GRP foram encontrados em 26% destes pacientes, sendo que os níveis mais altos deste biomarcador foram encontrados em pacientes com carcinomas epidermóides, quando comparados a pacientes com os adenocarcinomas [124][122].

Portanto, considera-se que o Pró-GRP ainda representa um biomarcador molecular em estudo para detecção precoce e monitoramento de pacientes com SCLC. Possivelmente, a combinação dos dois marcadores, o Pró-GRP e o NSE, possa ser uma ferramenta de maior sensibilidade e especificidade para o seguimento clínico de pacientes com carcinomas de pequenas células. No entanto, mais estudos prospectivos serão necessários para a validação deste marcador molecular [122][123].

## 4 Objetivos do Estudos

### 4.1 Objetivo Geral

Determinar a expressão de GRPR em diferentes tipos histológicos de neoplasias pulmonares em amostras de uma população ocidental e uma população oriental.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Comparar a expressão de GRPR com as características clínicas e demográficas dos pacientes como estágio clínico, tabagismo e gênero.
2. Avaliar influências da expressão do GRPR nas curvas de sobrevida global de ambas as populações.
3. Avaliar a relação entre a expressão de GRPR com a mutação do EGFR na população japonesa.
4. Comparar a expressão de GRPR entre as populações oriental e ocidental.

## 5 Justificativa

Atualmente, o câncer de pulmão é a principal causa global de morte por câncer, tanto em homens quanto em mulheres. De acordo com as projeções mais recentes, em 2030 será a terceira ou a quarta causa de morte em alguns países. Desconsiderando o tipo histológico desta neoplasia, a mortalidade em cinco anos é em torno de 85%. Estes resultados desfavoráveis são em parte devido ao diagnóstico clínico tardio e principalmente, às alternativas terapêuticas deficientes oferecidas aos pacientes. Infelizmente, estes números não se alteraram substancialmente nos últimos trinta anos, pois as taxas de sobrevida têm se mantido, apesar de inúmeras pesquisas e dos múltiplos estudos clínicos com novas drogas [6][27].

Nos últimos anos, o principal interesse das pesquisas tem sido identificar novos tratamentos baseados na identificação da presença de alterações genéticas, ou mecanismos de sinalização intracelulares alterados nas células tumorais que possam servir como alvos terapêuticos. O objetivo é não somente aumentar a sobrevida dos pacientes, mas também, diminuir a toxicidade das drogas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com câncer de pulmão. Embora a melhora da sobrevida, com estas novas drogas, até o momento, seja ainda muito modesta, a esperança é que a descoberta de um número aumentado de biomarcadores possa ser útil para predizer quais os pacientes são os mais prováveis de se beneficiarem de determinadas terapias [35].

Por tudo isso, há uma urgente necessidade de identificar novas alterações moleculares nas células tumorais. Devido a este fato, investigamos a presença

de alterações na expressão de receptores de GRP nos principais grupos histológicos das neoplasias pulmonares. Até o momento, não é conhecido o seu grau de expressão nos diferentes estágios clínicos e em diferentes origens populacionais com estas neoplasias. O melhor conhecimento do comportamento do GRPR no câncer de pulmão é o primeiro passo para o desenvolvimento de novas terapias-alvo contra estes tumores.

## 6 Materiais e Métodos

### 6.1 População Brasileira

Trata-se de um estudo retrospectivo em que foram selecionados mais de 330 casos de neoplasias pulmonares dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todas as amostras foram selecionadas de pacientes que sofreram ressecções cirúrgicas de lesões pulmonares ou biópsias diagnósticas desde janeiro de 2004 até dezembro de 2008. Somente foram incluídas amostras que apresentassem as histologias de adenocarcinomas, carcinomas epidermóides, carcinomas de grandes células e carcinomas de pequenas células. Os demais subtipos histológicos mais raros de câncer de pulmão foram excluídos.

De todas as amostras selecionadas, 238 foram identificadas como material satisfatório dos blocos de parafina. As demais foram descartadas por se tratarem de material insuficiente ou demasiadamente necrótico para análise de imuno-histoquímica. Para controle, foram selecionadas vinte e três amostras pulmonares que foram originárias de necrópsias. Os critérios de exclusão para a amostra controle foram neoplasia maligna de qualquer origem, tuberculose, aspergilose ou pneumonia extensa.

De todos os pacientes, foram coletados, através do Sistema de Informática do HCPA, todos os dados demográficos e informações clínicas como sexo, idade, história de tabagismo, estágio clínico da doença, data do diagnóstico, histologia, data de óbito ou da última vez em que o paciente esteve presente no hospital.

Todas as amostras foram obtidas de acordo com a aprovação do comitê

de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **6.1.1 Análise de Imuno-histoquímica**

Nos espécimes previamente fixados em blocos de parafina 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, inativação da peroxidase endógena através da imersão em peróxido de hidrogênio e o bloqueio das reações inespecíficas com soro normal. Foi utilizado o anticorpo primário de coelho anti-GRPR (OPA1-15619 Bioreagents, EUA) na diluição 1:200 e encubados por 12 horas, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako).

Para controle positivo, foi utilizado tecido de carcinoma de pâncreas. Para o controle negativo, foi omitida a utilização do anticorpo primário. A avaliação da coloração da imuno-histoquímica foi realizada por um patologista.

Cada caso foi representado por uma lâmina e foi realizada a coloração por imuno-histoquímica conforme descrito acima. Para cada slide, cinco campos microscópicos (aumento de 40 x) foram identificados e realizados os escores. A leitura de cada slide foi realizada de acordo com a intensidade e a porcentagem de células tumorais coradas pelo anticorpo. A intensidade positiva do tumor foi registrada na escala de 0 a 3 (0=ausência de expressão; 1=fraca expressão; 2=moderada expressão e 3=forte expressão). A porcentagem de células positivas foi registrada na escala de 0 a 3 (0=ausência de expressão; 1=<25% das células; 2=25 a 50% das células; 3=50 a 100% das células). Veja figura abaixo as imagens da imuno-histoquímica desde a ausência de



expressão de GRPR até a forte expressão deste marcador.

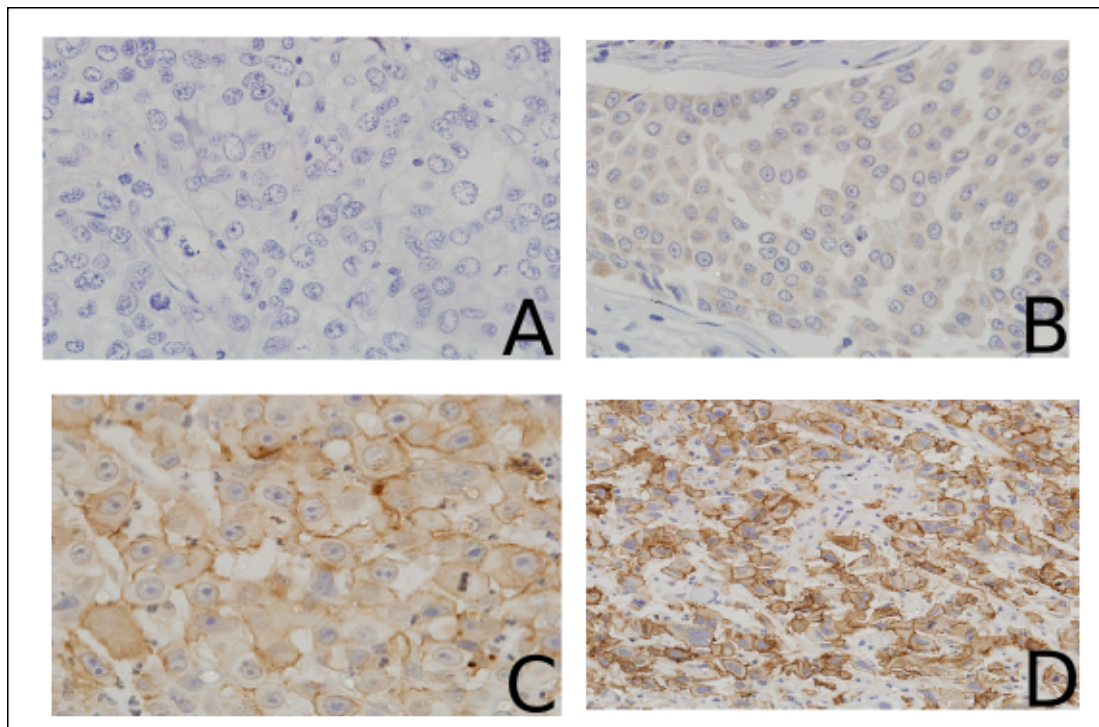


Figura 5: Diferentes intensidades de expressão de GRPR nas amostras tumorais estudadas (A) Ausência de Expressão (B) Fraca Expressão (C) Moderada Expressão (D) Forte Expressão (*Magnificação Original x 400*)

## 6.2 População Japonesa

Foram selecionados 70 pacientes dos registros da patologia do Hospital Universitário de Tokyo do ano de 1997 a 2007, que haviam realizado cirurgia de ressecção pulmonar ou de biópsia. Os pacientes incluídos foram os que apresentaram as histologias de adenocarcinomas, carcinomas epidermóides e carcinomas de grandes células. Os tumores de pequenas células não foram incluídos nesta amostra. Todo o material adquirido para a pesquisa obteve aprovação da organização de ética em pesquisa daquela instituição.

### 6.2.1 Construção de Blocos de Microarray (TMA)

Foram selecionadas áreas representativas de tumor de cada bloco de parafina, das amostras originais, a partir de sessões de hematoxilina-eosina. Estas áreas foram marcadas para a construção dos blocos de TMA. Dois pontos de 1 mm de diâmetro foram obtidos de cada espécime, com espaçamento de 0,8 mm entre os centros de referência. Estes dois pontos, ou núcleos, foram colocados em um novo bloco de parafina usando o instrumento Tissue Microarray Workstation. O aparelho é composto de paredes finas e agulhas de aço inoxidável com um diâmetro interno de cerca de 600  $\mu\text{m}$  que transfere o material do antigo para o novo bloco de parafina. A montagem foi realizada em um guia de posição XY que foi ajustado manualmente por micrômetros digitais. A lâmina final de microarray constituiu-se do número de pacientes multiplicados por três, porque foram três amostras de tecido de cada paciente que foram utilizadas. A figura abaixo representa uma lâmina de TMA.

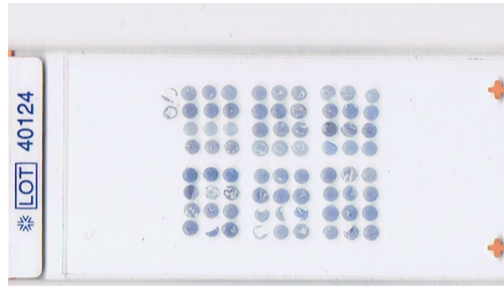


Figura 6: Representação de uma lâmina de TMA com 24 amostras de pacientes

### 6.2.2 Análise de Imuno-histoquímica

Após a construção dos blocos de TMA, foram cortadas as seções com 4 micrômetros de cada TMA a fim de construir as lâminas para a realização da imuno-histoquímica. Os slides foram incubados a 42°C por 12 horas, e então desparafinizados em xileno e reidratados através de concentrações graduais de etanol. Foi aplicado manualmente o anticorpo primário de coelho anti-GRPR (OPA1-15619 Bioreagents, EUA) na diluição 1:200 em cada um das lâminas; em seguida, foram colocados para automatização da imuno-histoquímica por 1 h e 60 min na Ventana Medical Systems. Foi utilizado o Kit para detecção Ultra View DAB UltraView DAB e desidratação em álcool de 70 a 100% e em xileno antes da aplicação das lamínulas. Como controle positivo, foi utilizado tecido pancreático. Quanto ao controle negativo, foi omitida a utilização do anticorpo primário.

Assim como na população brasileira, foram utilizados os mesmos escores de intensidade e frequências de coloração como descritos anteriormente. As lâminas de TMA apresentavam 3 amostras de cada paciente. Como padrão,

a amostra que apresentasse maior intensidade de coloração foi escolhida para os escores. Estes também foram realizados por um patologista. As intensidades e frequências de expressão de GRPR foram as mesmas descritas para a população brasileira.

### **6.2.3 Sequenciamento de DNA para Detecção de Mutação no EGFR**

As amostras para obtenção de DNA foram extraídas de tecidos neoplásicos pulmonares presentes em blocos de parafina (mesmos blocos utilizados para análise de imuno-histoquímica). Foram realizados cortes microtomizados de 5 µm. Estes cortes foram colocados em tubos e desparafinizados com xileno. Após o xileno ser removido, com lavagens de etanol, o tecido foi tratado com proteinase K para tornar o DNA disponível para amplificação (Kit para DNA-WAX™ DNA Extraction Kit). O DNA genômico foi amplificado pela técnica de PCR. O sequenciamento do gene EGFR foi realizado dos exons 18 ao 21. Os primers utilizados para amplificação foram:

- éxon 18 (senso:5-AGGGCTGAGGTGACCCTTGT-3; anti-senso: 5-TCCCCACCAGACCATGAGAG-3)
- éxon 19 (senso:5-ACCATCTCACAATTGCCAGTTAAC-3; anti-senso: 5-GAGGTTTCAGAGCCATGGACC-3)
- éxon 20 (senso:5-CTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGAT-3; anti-senso: 5-TTTGCGATCTGCACACACCA-3)
- éxon 21 (senso:5-TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTT-3; anti-senso: 5-ATGCTGGCTGACCTAAAGCC-3)

Para a técnica de PCR, foram utilizados os componentes padrões (TaqMan buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, primers conhecidos e Taq DNA polimerase). Os produtos do PCR foram purificados pelo Multiscreen 384-PCR (Millipore Corp, Bedford, CA). Os fragmentos sequenciados foram detectados por eletroforese capilar usando ABI Prism 3100 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster-City, CA).

### **6.3 Avaliação Estatística**

Para avaliação da associação entre os níveis de expressão de GRPR com as variáveis clinicopatológicas dos pacientes foram utilizados o teste Qui-quadrado de Pearson e o teste Exato de Fisher.

Para avaliação das curvas de sobrevida, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier com teste de log-rank. As curvas de sobrevida foram realizadas com ajuste para estágio clínico na população ocidental e para ambos estágio clínico e mutação no EGFR para a população oriental.

O nível de significância adotado foi de 5% e todas as análises foram realizadas por meio do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 19.0)

## **7 Resultados**

### **7.1 População Brasileira**

#### **7.1.1 Características Gerais dos Pacientes**

Foram utilizadas, no total, 238 amostras de neoplasias pulmonares, sendo

que a maioria apresentava histologia não-pequenas células com 200 (84,03%) pacientes e somente 38 (15,7%) com histologia SCLC. Na divisão dos sub-grupos, foram encontrados 100 (42,01%) amostras com adenocarcinoma, 71 (29,83%) com carcinomas epidermóides e 29(12,18%) com carcinomas de grandes células.

Em relação às características demográficas dos pacientes envolvidos nesta população, a maioria eram do sexo masculino 132 (55,46%) e do sexo feminino 106 (44,53%). Na amostra foi verificado que 84,03% eram tabagistas, 3,36% não apresentavam história de tabagismo e em 12,60% dos pacientes este perfil era desconhecido.

Mais da metade dos indivíduos apresentaram, ao diagnóstico, com doença avançada, EC IV ou doença extensa, ou seja 139 (59,9%) pacientes, 53 (22,84%) EC IIIA e/ou IIIB, 37 (15,94%) com EC I ou II. Em seis pacientes da amostra, não houve registro desta variável. Em relação aos carcinomas de pequenas células, doença limitada, houve registro de apenas três pacientes; por tal razão, os resultados não foram inseridos na distribuição dos estágios clínicos.

A média de idade ao diagnóstico para a população em geral foi de 63,08 anos. Não houve diferença significativa na idade média ao diagnóstico entre os homens (61,08 anos) comparados com as mulheres (63,44 anos).

A sobrevida média de todos os pacientes com o agrupamento dos estágios clínicos foi de 10,3 meses. As mulheres apresentaram sobrevida de 10,65 meses e o homens 10,02 meses.

Tabela 1: Características clínicas e demográficas dos pacientes da população ocidental (n=238)

<b>Características Clínicas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Média</b>
<b>Sexo</b>			
Feminino	106	44.53	
Maculino	132	55.46	
<b>Idade ao Diagnóstico Geral</b>			63.08 a.
Mulheres			63,44 a.
Homens			61,08 a.
<b>Tabagismo</b>			
Sim	200	84.03	
Não	8	3.36	
Desconhecido	30	12.6	
<b>Histologia</b>			
<b>NSCLC</b>	200	84,03	
Adenocarcinomas	100	42.01	
Ca Epidermóides	71	29.83	
Ca Grande Células	29	12.18	
<b>SCLC</b>	38	15.96	
<b>Estágio Clínico %</b>			
I and II	37	15.54	
III	53	22.26	
IV	102	42.85	
Doença Limitada	3	1.26	
Doença Extensa	37	15.54	
<b>Sobrevida Geral</b>			10.03 m
Mulheres			10.65 m
Homens			10.02 m
a - anos	m- meses		

### 7.1.2 Expressão de GRPR em Diferentes Histologias de Câncer de Pulmão

A distribuição da expressão de GRPR, nos diferentes grupos histológicos, mostrou dados mais expressivos do GRPR nas histologias NSCLC, comparados com os SCLC. Dentre os 100 adenocarcinomas, 68 (68%) foram positivos

para GRPR. A forte expressão deste marcador foi presente em 10% dos adenocarcinomas, sendo que este achado se destacou em relação às outras histologias (Gráfico 7). Esta intensidade de expressão, esteve presente em mais de 50% das células na amostra tumoral. A tabela 3 sumariza os resultados das frequências médias de coloração da imuno-histoquímica, em cada nível de intensidade, nos diferentes subtipos histológicos.

Nos carcinomas epidermóides, 40 (56,32%) deles expressaram GRPR. O grupo de fraca intensidade de GRPR (40,84%) esteve presente em menos de 25% das células. Por outro lado, os níveis de moderada a forte intensidade de expressão estiveram presentes em mais de 50% das células avaliadas. Dos carcinomas de grandes células, 17 (58,62%) foram positivos para GRPR. Eles apresentaram, após os adenocarcinomas, os segundos maiores níveis de forte expressão.

Finalmente, os carcinomas de pequenas células 20 (52,63%) foram positivos para GRPR. Em relação às demais histologias, apresentaram as menores taxas de GRPR com forte intensidade (2,63%). No entanto, a moderada intensidade de expressão (15,78%) foi importante neste grupo.

No entanto, estas diferenças de expressão de GRPR nos tipos histológicos de câncer de pulmão não tiveram uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,673$ ).



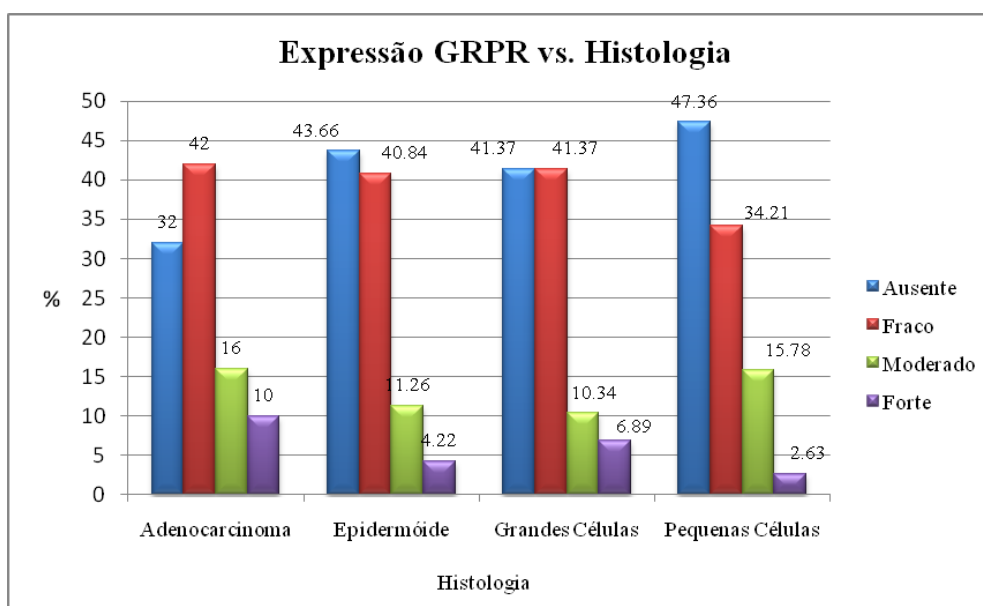


Figura 7: Expressão de GRPR nos diferentes tipos histológicos de neoplasias pulmonares dos pacientes ocidentais

Tipo Histológico	Negativo	1-25%			25-50%			50-100 %		
		1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+
Adenocarcinoma (n=100)	32	17	0	0	12	2	0	13	14	10
Epidermóide (n=71)	31	7	0	0	7	1	0	15	7	3
Grandes Células (n=29)	12	6	0	0	3	1	0	3	2	2
Pequenas Células (n=38)	18	5	0	0	3	0	0	5	5	1

Tabela 2: Frequências de intensidades de expressão de GRPR nos diferentes grupos histológicos

### 7.1.3 Distribuição do GRPR e Gênero

Foram comparadas as diferentes expressões de GRPR nos sexos masculino e feminino. Na análise estatística, não obtivemos as mesmas proporções

deste marcador, conforme relatado na literatura que demonstra uma expressão acentuada de GRPR nas mulheres em relação aos homens.

Em nossa amostra, a forte expressão de GRPR foi praticamente a mesma em ambos os sexos. A fraca e a moderada expressão foi levemente superior nos homens em relação às mulheres. Quando foi comparada a presença ou não de GRPR, a população feminina apresentou maior expressão deste receptor comparados à população masculina. No entanto, estas diferenças de expressão de GRPR em relação ao gênero, não foram estatisticamente significativas ( $p=0,910$ ). Veja abaixo, o gráfico.

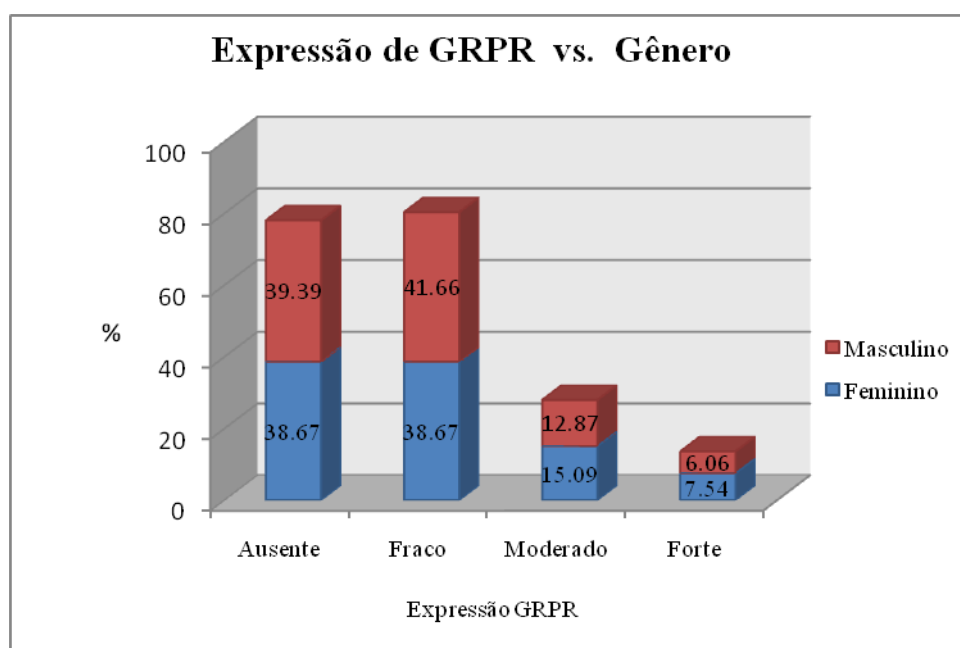


Figura 8: Distribuição de intensidades de expressão GRPR nos sexos masculino e feminino

#### 7.1.4 Relação da Expressão de GRPR nos Estágios Clínicos

Nos pacientes com estágio clínico precoce de câncer de pulmão, ou seja, EC I e II, nenhum deles apresentou uma expressão acentuada do receptor de GRPR. Nestes estágios clínicos, foi mais frequentemente encontrada a ausência de expressão deste receptor. Quando comparamos este grupo com os demais estágios clínicos, constatamos que este biomarcador se encontrou menos presente nos estágios iniciais do câncer de pulmão.

Por outro lado, em estágios mais avançados das neoplasias pulmonares, tanto em NSCLC, quanto em SCLC, houve maior expressão dos níveis moderados de GRPR. Os graus máximos de expressão proteica deste receptor estiveram presentes nos EC III e IV dos NSCLC. Veja a figura 9.

Os resultados demonstram que a expressão de GRPR poderia ser um marcador molecular que possa desempenhar um papel importante no desenvolvimento e na proliferação de tumores com comportamento biológico mais agressivo. Portanto, este receptor celular se mostrou muito mais proeminente em estágios clínicos mais avançados, tanto nas neoplasias não-pequenas quanto nas neoplasias de pequenas células. Estes resultados foram estatisticamente significativos ( $p=0,010$ ).

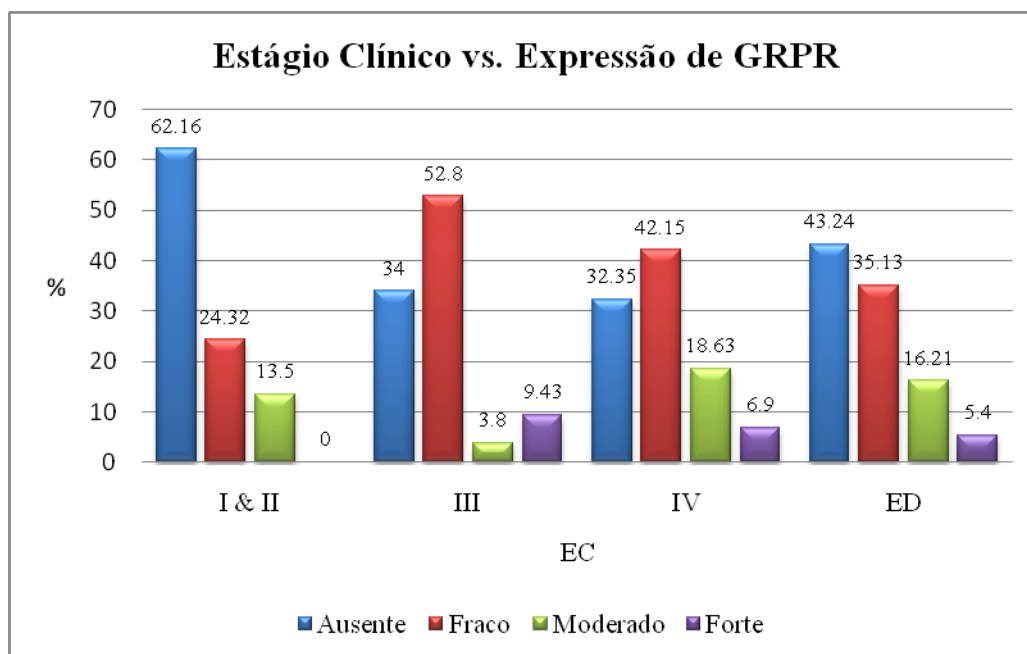


Figura 9: Intensidades de expressão de GRPR nos estágios clínicos dos tumores pulmonares dos pacientes brasileiros

#### 7.1.5 Expressão de GRPR em Tecidos Pulmonares sem Neoplasia

A expressão de GRPR também foi realizada em grupos controles, justamente para observar a diferença de expressão de GRPR em neoplasia em relação ao tecido pulmonar não neoplásico. Foram utilizadas amostras de necrópsia de 23 pacientes, sem neoplasias pulmonares. As principais causas mortis destes pacientes foram: asma, broncopneumonia, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio, sepsis e insuficiência renal.

Os resultados da expressão de GRPR mostraram que 52,17% dos pacientes não apresentaram qualquer expressão deste marcador, e 47,82% apresen-

taram apenas uma fraca expressão. Não encontramos amostras com intensidades de expressão moderada a forte.

Foi detectada uma diferença estatisticamente significativa nas amostras de tecido pulmonar neoplásico em relação ao tecido pulmonar normal quanto à expressão de GRPR ( $p=0,049$ ).

Abaixo, a representação demonstra com mais detalhes os resultados mencionados.

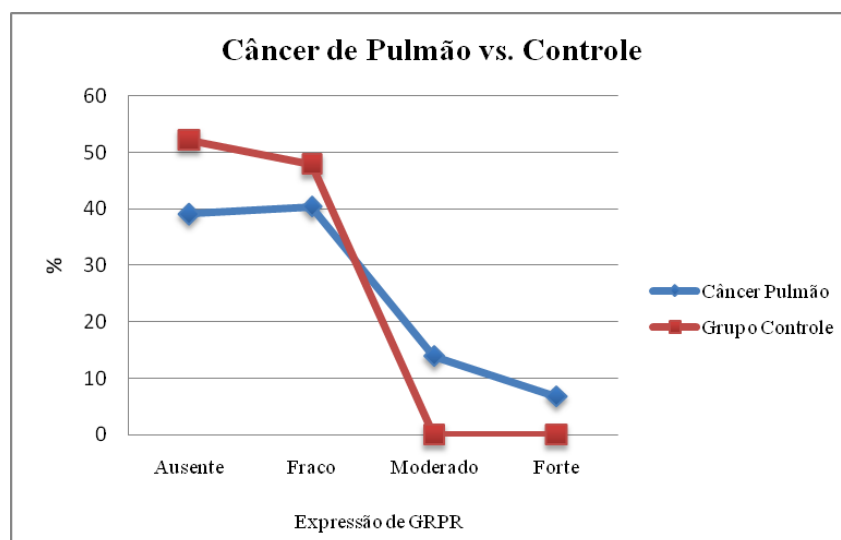


Figura 10: Expressão de GRPR em tecido pulmonar com presença e ausência de neoplasia

#### 7.1.6 GRPR e Tabagismo

Dentre as 238 amostras estudadas, 200 foram provenientes de pacientes tabagistas e apenas 8 amostras não tinham história de tabagismo. As 30 amostras tumorais restantes, foram de pacientes cujo estatus de tabagismo era desconhecido.

Devido à grande diferença de proporções entre tabagistas e não-tabagistas não foi possível calcular as diferenças de expressão de GRPR nos dois grupos.

#### **7.1.7 Curvas de Sobrevida**

A curva de sobrevida foi realizada nos 238 pacientes da amostra brasileira. A curva mostrou um tempo médio de seguimento de 15,2 meses. A média de sobrevida foi de 10 meses (IC 95%, 5,9 a 13,3). Foi comparada a curva de sobrevida com a expressão de GRPR. Observou-se não haver diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre os pacientes que apresentaram altos ou baixos níveis deste receptor (log-rank,  $p=0,43$ ). Nesta análise, os valores foram ajustados para o estágio clínico.

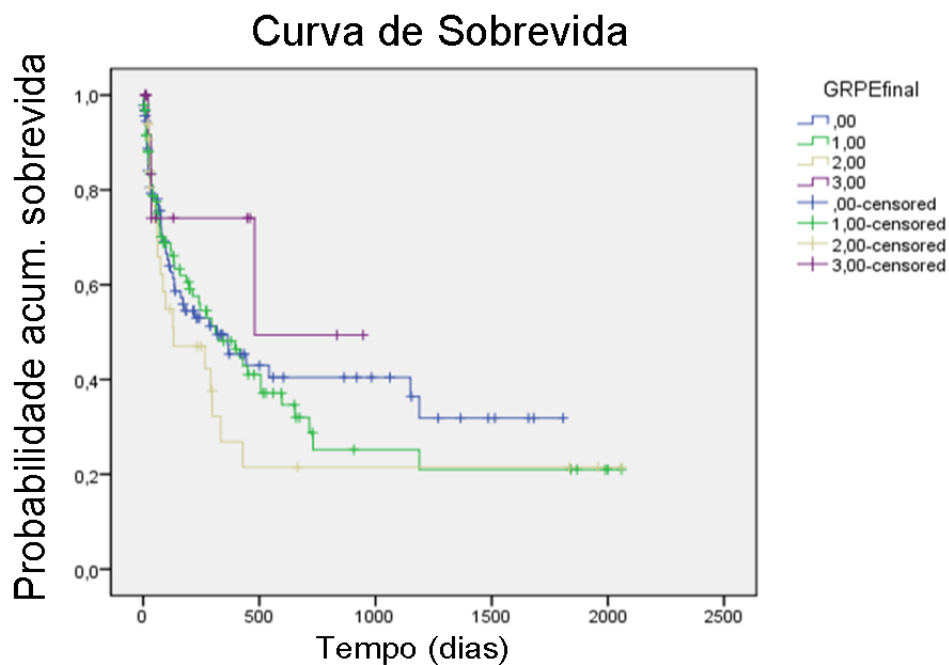


Figura 11: Curvas de sobrevida dos pacientes brasileiros em relação aos níveis de expressão de GRPR

## 7.2 População Japonesa

### 7.2.1 Características Gerais dos Pacientes

Na população Japonesa, 96 amostras de neoplasias pulmonares foram utilizadas. Destas, a maioria eram adenocarcinomas, 82 (85,4%), seguidos por carcinomas epidermóides, 9 (9,4%), e os carcinomas de grandes células representados por apenas 5 (5,2%). Nenhuma das amostras foram representadas por carcinomas de pequenas células.

Em relação às características demográficas dos pacientes japoneses, 46

(47,9%) eram do sexo masculino e 50 (52,17%) do sexo feminino. Em nossa amostra, 47 (49 %) não apresentavam história de tabagismo, enquanto que 49 (51%) eram tabagistas.

A maioria dos pacientes apresentavam doença em estágios precoces, sendo que 45 (46,9%) encontravam-se em EC I & II, 44 (45,8%) no EC III e apenas 7 (7,3%) dos pacientes apresentavam doença avançada, ou seja, EC IV.

Na população japonesa estudada, no momento do diagnóstico, a média de idade foi cerca de 61 anos, sendo 63,2 anos para as mulheres e 59,58 anos para os homens. A sobrevida média dos pacientes japoneses da amostra foi de 53,17 meses, quando os pacientes foram agrupados, desconsiderando os diferentes estágios clínicos.



Tabela 3: Características clínicas e demográficas dos pacientes da população oriental (n=96)

<b>Características Clínicas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Média</b>
<b>Sexo</b>			
Feminino	50	52,1	
Masculino	46	47,9	
<b>Idade ao Diagnóstico</b>			
Feminino			61,46 a.
Masculino			63,02 a.
<b>Tabagismo</b>			
Sim	49	51,0	
Não	47	49,0	
<b>Histologia</b>			
Adenocarcinomas	82	85,4	
Ca Epidermóides	9	9,4	
Ca Grandes Células	5	5,2	
<b>Estágio Clínico %</b>			
I and II	45	46,9	
III	44	45,8	
IV	7	7,3	
<b>Sobrevida</b>			53,17 m
m. - meses	a. - anos		

### 7.2.2 Expressão de GRPR em Diferentes Histologias

O grupo histológico dos adenocarcinomas foi o único que apresentou moderados níveis de expressão de GRPR, representando um total de 37,8% dos pacientes. Tanto os adenocarcinomas quanto os carcinomas epidermóides mostraram uma fraca expressão deste marcador, representando um total de 53,65% e 66,66% respectivamente. Além disso, ambas as intensidades de expressões nos adenocarcinomas, fraca e moderada, estiveram presentes em

mais de 50% das células tumorais.

Houve fraca expressão de GRPR na maioria dos carcinomas de grandes células, no entanto, é difícil chegarmos a alguma conclusão, pois este grupo foi representado apenas por 5 pacientes do total. Uma única amostra de paciente com carcinoma epidermóide apresentou forte expressão de GRPR. As diferenças de expressão de GRPR nos tipos histológicos, mostraram resultados estatisticamente significativos ( $p=0,03$ ).

Abaixo, representados graficamente estes resultados.

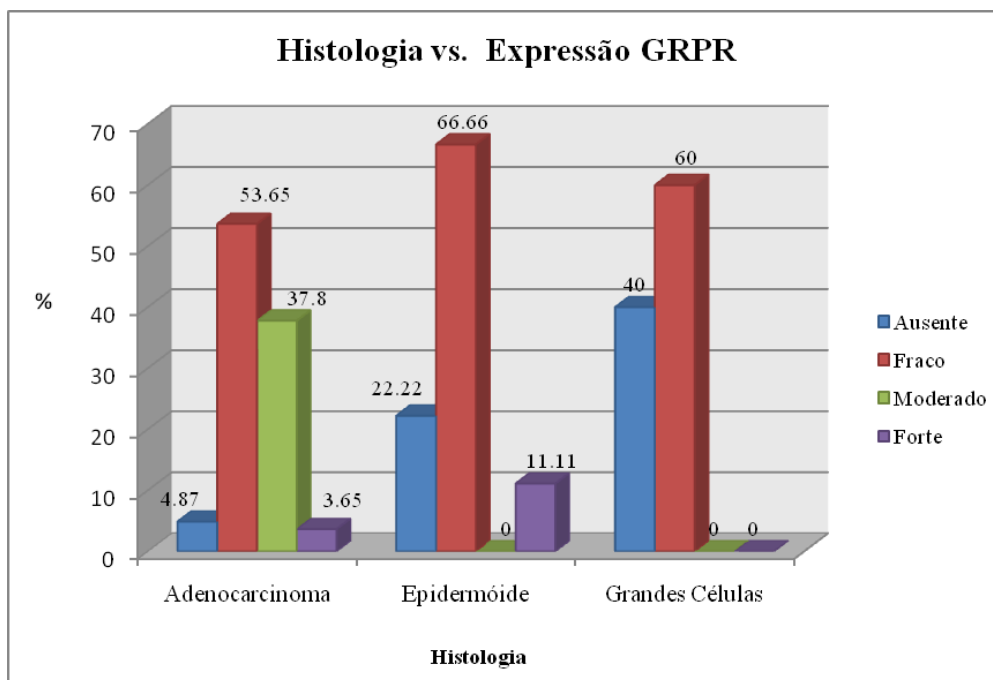


Figura 12: Expressão de GRPR nos diferentes tipos histológicos de neoplasias pulmonares das amostras de pacientes orientais

<b>% Células Tumorais Coradas</b>										
<b>Tipo Histológico</b>	<b>Negativo</b>	<b>1%-25%</b>			<b>25-50%</b>			<b>50-100 %</b>		
		<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>
Adenocarcinoma (n=82)	4	4	0	0	4	0	0	36	31	3
Epidermóide (n=9)	2	3	0	0	0	0	0	3	0	1
Grandes Células (n=5)	1	1	0	0	2	0	0	1	0	0

Tabela 4: Frequências de Expressão de GRPR nos Diferentes Grupos Histológicos

### 7.2.3 Mutação do Gene EGFR e Expressão de GRPR

Dentre os 96 pacientes japoneses estudados, a mutação no gene do EGFR foi encontrada em 54 (60%) dos pacientes e 36 (40%) apresentaram EGFR do tipo selvagem, ou seja, não apresentaram as mutações procuradas. Nesta amostra, em 6 (6,25%) pacientes a mutação não foi realizada por se tratar de material insuficiente. Dentre as mutações encontradas, 27 (30%) foram do éxon 19, 19 (21,11%) do éxon 20, 16 (17,77%) do éxon 21 e apenas 2 (2,22%) do éxon 18.

O estatus do gene EGFR foi avaliado em relação aos resultados da expressão de GRPR nestes mesmos pacientes. Apenas 6 (6,66%) pacientes japoneses foram negativos para a expressão de GRPR. Por consequência, a expressão deste marcador foi distribuída nas diferentes intensidades, para a comparação com os pacientes que apresentavam mutação no gene EGFR.

Foi observado que a expressão de GRPR não se alterou significativamente em função da presença ou não da mutação no EGFR. A fraca expressão resultou em 57,4% dos EGFR mutados e 52,57% daqueles não mutados. O

mesmo comportamento do GRPR foi em relação à moderada expressão deste marcador, com 33,33% de expressão nos EGFR mutados, e 36,11% no EGFR tipo selvagem. A forte expressão de GRPR foi observada principalmente nos pacientes que apresentaram o EGFR tipo selvagem com 5,55 % deles. Todas estas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p= 0,769$ ).

Veja os resultados no gráfico abaixo.

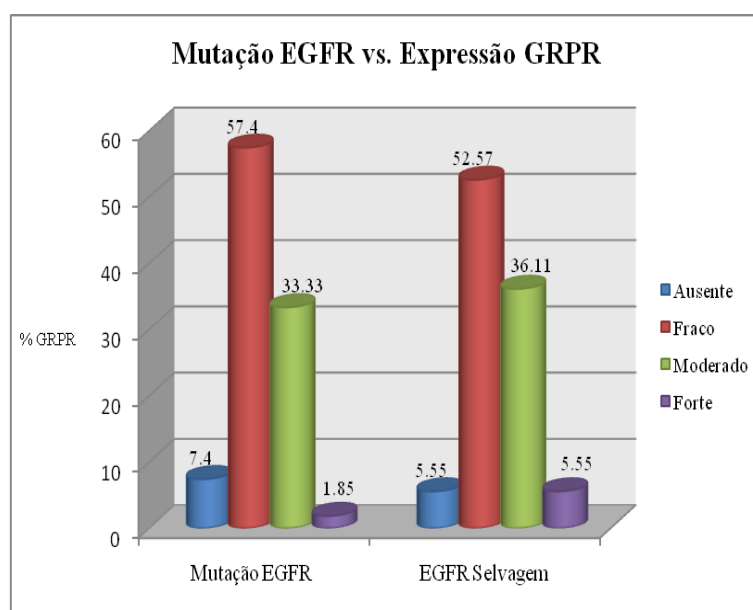


Figura 13: Expressão de GRPR em relação à presença e à ausência de mutação no EGFR

#### 7.2.4 Estágio Clínico e Expressão de GRPR

Assim como na população brasileira, foi comparada a expressão de GRPR, de acordo com as intensidades, em relação aos estágios clínicos dos pacientes. Aqueles com estágios clínicos precoces de câncer de pulmão apresentaram as maiores taxas de fraca expressão de GRPR. Foram observados níveis

acentuados de moderada expressão deste marcador apenas em estágios mais avançados da doença, com 41,66% no EC III. O EC IV, embora esteja representado no gráfico, apenas sete pacientes pertenceram a este grupo. Os resultados da expressão de GRPR nos estágios clínicos não foram estatisticamente significativos ( $p=0,541$ ).

Estes dados estão melhor representados abaixo.

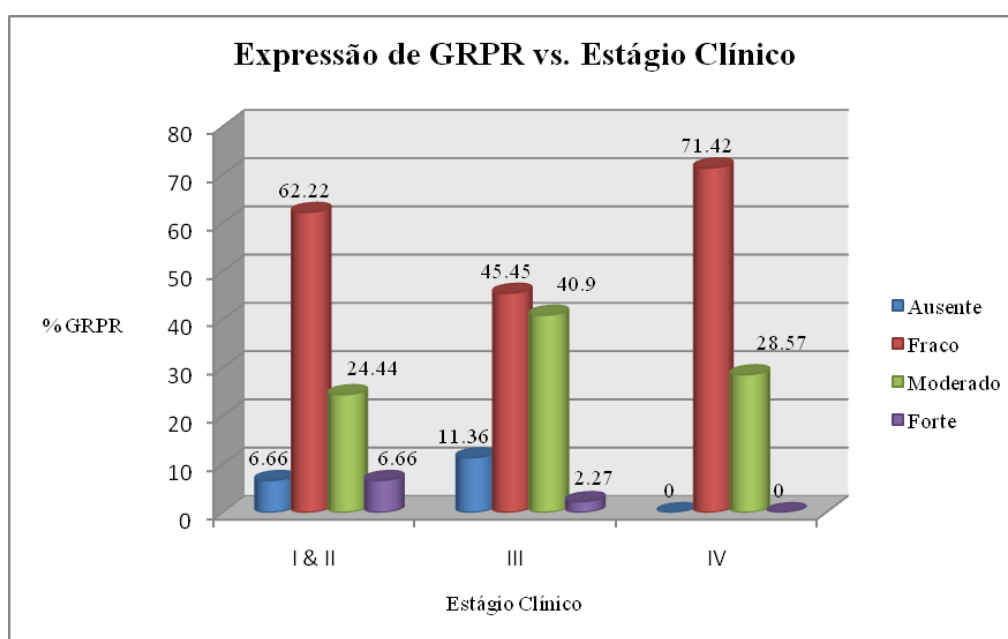


Figura 14: Intensidades de expressão de GRPR nos estágios clínicos dos tumores pulmonares nos pacientes japoneses

### 7.2.5 Distribuição do GRPR em Relação ao Gênero

Assim como na população brasileira, foram comparadas as distribuições do GRPR entre os sexos masculino e feminino. Nas diferentes intensidades de expressão deste biomarcador molecular, houve distribuição muito semelhante

tanto nos homens quanto nas mulheres. No entanto, a forte expressão de GRPR esteve presente apenas nas mulheres com 8% e total ausência nos homens. Entretanto essas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p= 0,304$ ). Estes dados estão melhor ilustrados no gráfico abaixo.

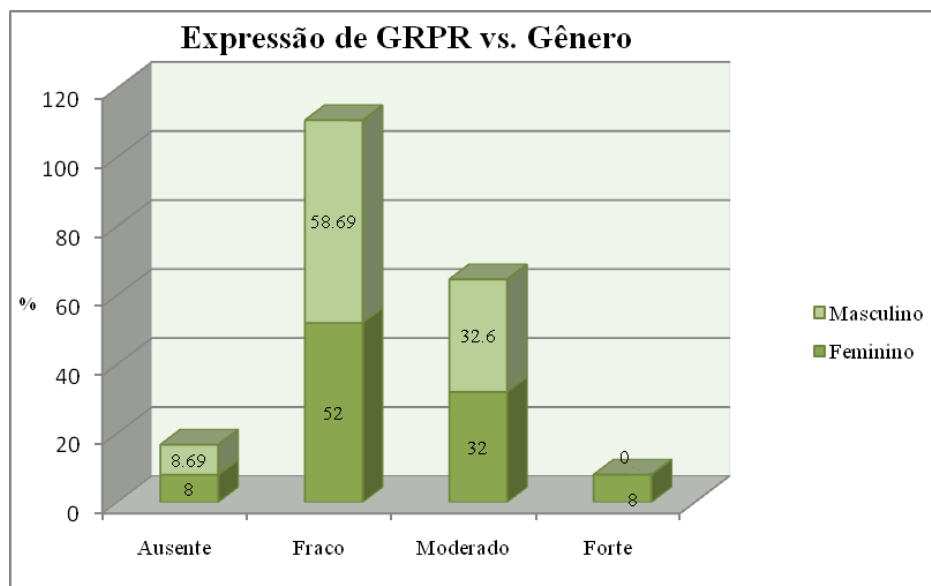


Figura 15: Distribuição do GRPR em homens e mulheres da amostra de pacientes orientais

### 7.2.6 Curvas de Sobrevida

A curva de sobrevida foi realizada nos 96 pacientes japoneses. A curva mostrou um tempo médio de seguimento de 72 meses. A média de sobrevida foi de 53 meses (IC 95%, 41,2 a 56,8). As curvas de sobrevida foram comparadas com os níveis de intensidade de expressão de GRPR. Os pacientes que expressaram baixos níveis de GRPR, ausente e/ou fraco apresentaram uma sobrevida média de 56,16 meses (IC 95%, 38,2-71,2) comparados aos moderados e/ou fortes com 37,9 meses (IC 95%, 38,2-71,2). As diferenças fo-

ram estatisticamente significativas (HR=1,9 p=0,010). A análise foi ajustada para ambos estágio clínico e para mutação de EGFR.

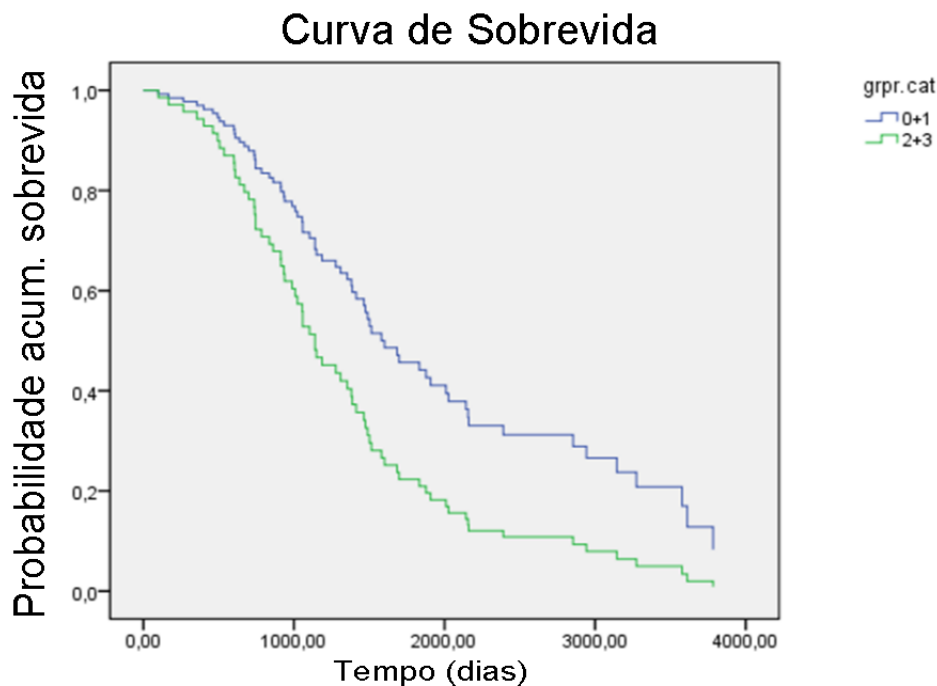


Figura 16: Curvas de sobrevida dos pacientes japoneses em relação aos níveis de expressão de GRPR

### 7.2.7 GRPR e Tabagismo

Dentre as 96 amostras de pacientes japoneses estudadas, a proporção de tabagistas 51%, foi muito semelhante aos não-tabagistas 49%. Quando esta característica foi comparada em relação às intensidades de expressão de GRPR, observamos que tanto a baixa quanto a moderada e alta expressão não apresentaram diferenças entre o grupo de pacientes tabagistas e não tabagistas (p=0,992).

Veja abaixo a figura.

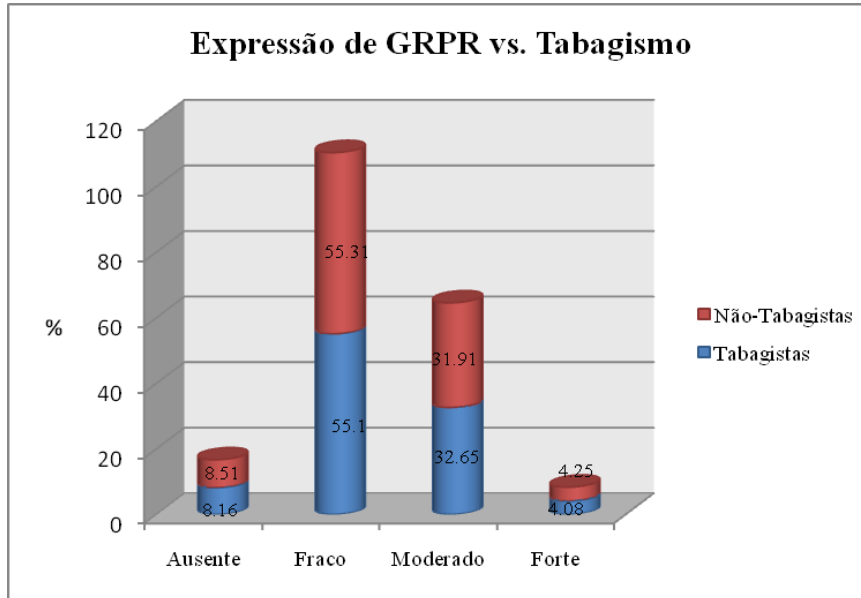


Figura 17: Diferenças de expressão de GRPR em relação ao status tabagismo

### 7.2.8 Comparação entre População Japonesa e Brasileira na Expressão de GRPR

Foi realizada uma comparação entre a presença de expressão de GRPR na população brasileira e japonesa. Tendo em vista que o grupo de pacientes japoneses apresentavam apenas neoplasias não-pequenas células, comparou-se com este mesmo grupo histológico da população brasileira.

Na análise de expressão de GRPR em relação à presença ou à ausência deste marcador, ficou constatado que 91,96% das amostras dos pacientes japoneses foram positivas para expressão de GRPR. Nos pacientes brasileiros, no entanto, foram positivos para a expressão de GRPR em 62,5% deles. Os resultados foram estatisticamente significativos ( $p=0,001$ ).

Veja a figura abaixo.



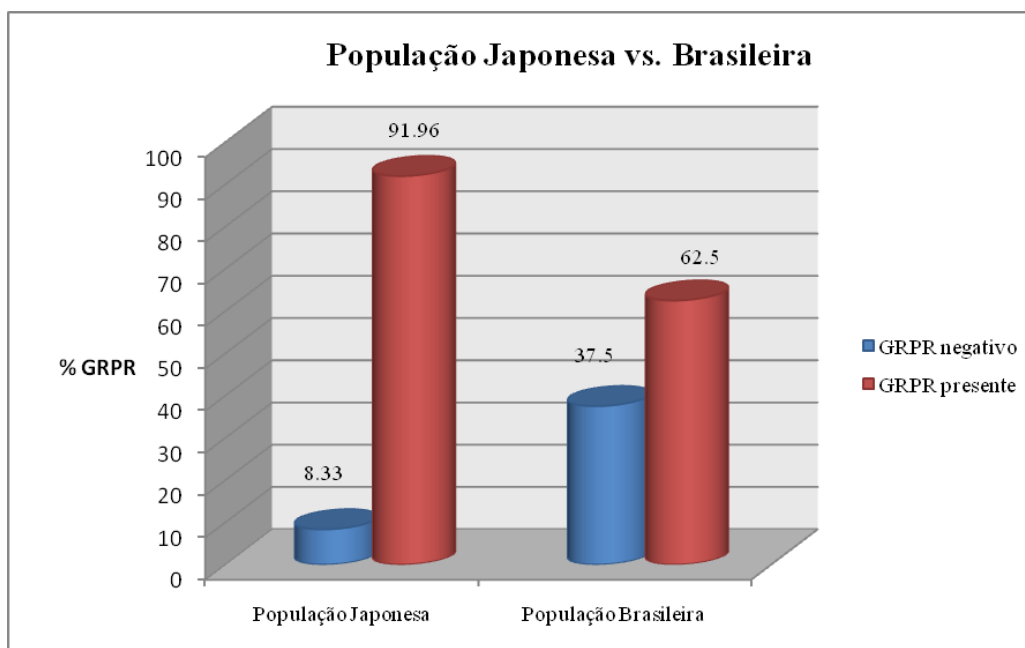


Figura 18: Comparação da expressão de GRPR em pacientes japoneses vs. brasileiros

Convém salientar que dos 96 pacientes da população japonesa, 82 (85,41%) apresentavam adenocarcinomas. Os dados desta amostra foram comparados com os adenocarcinomas da população brasileira.

Após a distribuição das intensidades da expressão de GRPR, a população japonesa apresentou maiores proporções de expressões deste marcador, tanto na intensidade fraca 53,65% e moderada 37,8% quanto comparados com a população brasileira, fraca 42% e moderada 16%. As diferenças foram estatisticamente significativas ( $p=0,02$ ).

Veja representação gráfica na figura abaixo.

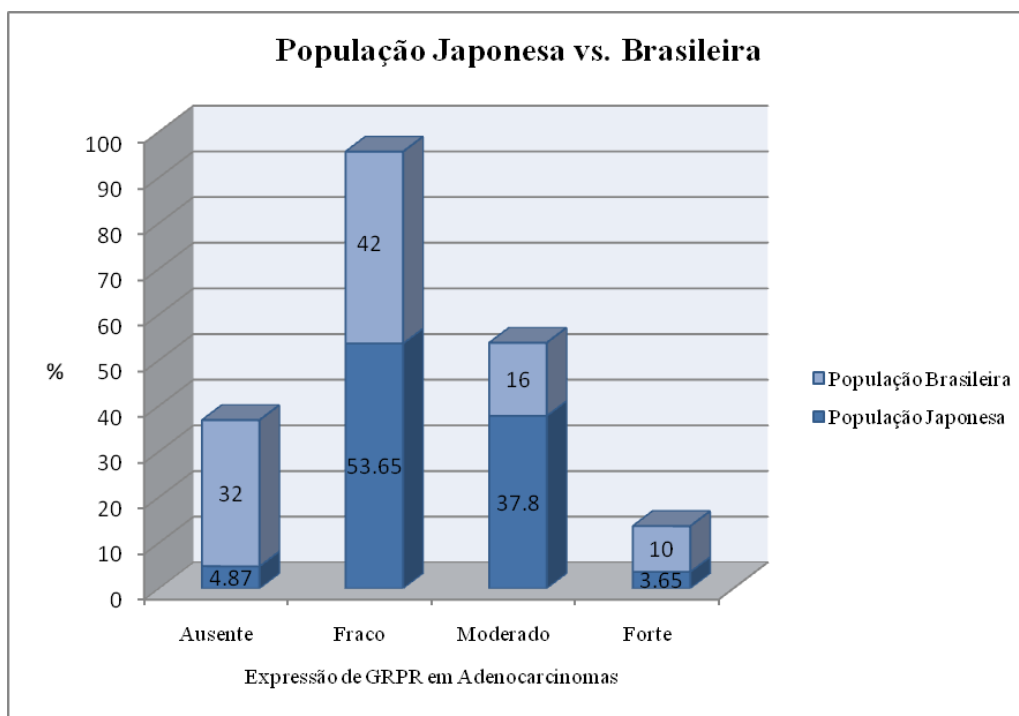


Figura 19: Intensidades de expressão de GRPR em adenocarcinomas de pacientes ocidentais e orientais

## 8 Discussão

O GRPR tem sido extensivamente estudado em câncer de mama, próstata, cólon entre outras [65][84][91]. Em neoplasias pulmonares, no entanto, este receptor não tem sido muito explorado até o momento. Vários estudos têm sido relatados em relação à expressão de GRPR nos tumores pulmonares, porém a maior parte deles foram realizados *in vitro* [81][107]. Este é o primeiro estudo o qual se tem registro que avaliou um grande número de pacientes em relação à expressão deste marcador molecular. Neste tra-

balho encontraram-se os mais altos níveis de expressão deste marcador em NSCLC comparados com os SCLC, de modo especial nos adenocarcinomas. A expressão intensa deste receptor em adenocarcinomas, não previamente observada em estudos anteriores, pode identificar um possível alvo para o desenvolvimento de novas terapias.

Levando-se em conta o que foi mencionado anteriormente, o presente trabalho é o primeiro a relatar a distribuição deste biomarcador nos diferentes estágios clínicos das neoplasias pulmonares. Observou-se que as intensidades de expressão de GRPR foram muito mais notáveis em estágios clínicos avançados da doença, EC IV, que em estágios precoces, EC I e II. Ainda, nestes estágios iniciais desta doença, concluiu-se que mais da metade dos pacientes não expressaram GRPR. Estes achados sugerem fortemente que o GRP e seu receptor exerce um papel mitogênico e pode desempenhar um papel fundamental na carcinogênese de tumores com um comportamento mais agressivo.

Conforme relatado previamente em linhagens celulares, a expressão de GRPR é muito mais frequentemente encontrada em células neoplásicas que em células normais [114]. Este estudo confirma estes achados prévios, pois nas amostras de tecido pulmonar não neoplásico, houve ausência deste marcador na maioria dos tecidos e os que apresentaram expressão foram apenas na mais baixa intensidade. Mais uma vez, a presença de GRPR com mais intensidade em tecido neoplásico corrobora a hipótese de que ele participa no desenvolvimento e na progressão da transformação maligna em células tumorais pulmonares.

A expressão acentuada de GRPR nas histologias de adenocarcinomas mo-

tivou os autores deste trabalho a procurar a distribuição deste biomarcador e correlacionar com a mutação do EGFR em outros grupos étnicos de pacientes. Conforme discutido extensivamente neste trabalho, a distribuição do EGFR é totalmente distinta e tem importantes implicações prognósticas na população ocidental e oriental.

Não se conhece, até o momento, a distribuição da expressão de GRPR em diferentes grupos étnicos. Por isso, este receptor foi também estudado na população japonesa e após, foi comparado com a população brasileira. Infelizmente, não houve amostras de pacientes orientais com SCLC. Dos pacientes com NSCLC, os adenocarcinomas também tiveram os maiores níveis de expressão de GRPR. Em relação ao estágio clínico, embora muito poucos pacientes se apresentavam no EC IV, os níveis de moderada expressão foram maiores em estágios EC III, apesar de se ter apenas três pacientes com forte expressão nos EC I e II.

Os caminhos de ligação intracelular entre o GRPR e o EGFR estão bem documentados na literatura, principalmente em neoplasias de cabeça e pescoço [125][71][72]. O objetivo deste trabalho também foi verificar qual o comportamento da expressão de GRPR em pacientes que apresentavam a mutação no domínio do EGFR. Em conclusão, embora as diferenças não foram estatisticamente significativas, os pacientes sem a mutação no EGFR apresentaram intensidades maiores de expressão de GRPR. Tais resultados corroboram a hipótese de que o EGFR, quando mutado, sofre autofosforilação de forma que independe de receptores acoplados à proteína G assim como o GRPR. Deste modo, o GRPR teria maior importância, como um alvo terapêutico, em pacientes com EGFR tipo selvagem.

Os resultados deste trabalho não tiveram uma concordância com a literatura em relação à distribuição de GRPR conforme o gênero. Alguns estudos mostram que a distribuição do GRPR é maior em mulheres [10][11][117]. Nesta pesquisa, os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de expressão de GRPR em homens e em mulheres. Os resultados foram os mesmos nas duas populações estudadas.

A literatura demonstra que a expressão de GRPR em pacientes tabagistas é muito maior comparados aos não-tabagistas [116][117]. Os dados deste estudo não corroboram estes achados, pois as diferenças de intensidades deste receptor não foram estatisticamente diferentes entre ambos os grupos na população oriental. Na população ocidental devido ao pequeno número de não-tabagistas, não foi possível realizar estas proporções.

Quanto às diferenças étnicas de expressão de GRPR, observou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre os brasileiros e os japoneses. Estes têm a presença deste receptor mais frequentemente que a população ocidental. Além disso, em relação às intensidades nos adenocarcinomas, os japoneses apresentam maiores intensidades fraca a moderada, enquanto que os brasileiros apresentam maior frequência de forte expressão de GRPR.

Conclui-se que a melhor compreensão dos eventos moleculares presentes nas células tumorais é o primeiro passo para o desenvolvimento de uma terapia sistêmica capaz de melhorar a sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão. Neste trabalho, ficou demonstrado que o GRPR está altamente expresso em neoplasias pulmonares e parece apresentar alguma função na progressão e no desenvolvimento destes tumores. Os referidos resultados in-

dicam que este receptor poderia ser um importante candidato para a novas terapias-alvo em neoplasias pulmonares. No entanto, estudos adicionais são necessários para consolidar esses achados.

## 9 Conclusões

As conclusões deste estudo em relação à expressão de GRPR nas neoplasias pulmonares concernentes às duas populações:

### **População Ocidental**

1. A expressão de GRPR, nos diferentes tipos histológicos de neoplasias pulmonares demonstrou que as fortes intensidades deste marcador estiveram mais presentes nos adenocarcinomas comparadas às outras histologias.
2. Nos estágios clínicos mais avançados das neoplasias pulmonares, EC III e IV dos NSCLC, houve maior expressão dos níveis moderados e máximos de GRPR. Em contraste, nos estágios clínicos precoces desta doença, a maioria dos pacientes não apresentaram nenhuma expressão deste marcador molecular.
3. Constatou-se que não houve diferenças na expressão do GRPR entre os sexos masculino e feminino.
4. Foram encontradas diferenças significativas de expressão de GRPR em tecidos pulmonares não-neoplásicos comparados àqueles com presença

de tumor. Os tecidos controles apenas tiveram fraca e/ou ausência de expressão deste marcador.

5. Não houve diferença nas curvas de sobrevida em relação à expressão de GRPR, quando ajustadas para estágio clínico.

### **População Oriental**

1. Dentre as amostras de NSCLC avaliadas nesta população, os adenocarcinomas apresentaram semelhantes resultados em relação à população ocidental. No entanto, os carcinomas epidermóides mostraram maiores níveis de forte expressão de GRPR.
2. Os EC III e IV mostraram os maiores níveis de moderada expressão de GRPR; embora diferentemente da população ocidental, 6,6% deles expressaram fortes níveis de GRPR em estágios clínicos precoces.
3. Como na população anterior, não houve diferenças de expressão de GRPR quanto ao gênero. Além disso, a distribuição deste marcador foi semelhante em tabagistas e não-tabagistas.
4. A expressão do GRPR não se alterou significativamente em função da presença ou não da mutação no EGFR. No entanto, somente os pacientes que apresentaram o EGFR do tipo selvagem apresentaram forte expressão deste receptor.
5. Pacientes com níveis mais intensos de expressão de GRPR apresentaram uma sobrevida menor comparados àqueles com intensidade menor

de expressão do receptor (HR=1,9 p=0,010).

### **Comparações entre as Populações**

1. Na comparação entre as amostras de NSCLC das duas populações, observou-se diferenças estatisticamente significativas na expressão de GRPR. Este esteve mais presente nos pacientes orientais com 91,96% comparados aos ocidentais com 62,5%, (p=0,001).
2. Destaca-se ainda que, na distribuição das intensidades nos adenocarcinomas, a população japonesa apresentou maiores proporções de expressões deste marcador, tanto na intensidade fraca quanto moderada. Entretanto, fortes níveis de intensidade foram vistos mais frequentemente na população ocidental.



## Referências

- [1] A. Jemal, M. Thun, L. Ries, H. Howe, H. Weir, M. Center, E. Ward, X. Wu, C. Eheman, R. Anderson, *et al.*, “Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, no. 23, p. 1672, 2008.
- [2] M. Horner, L. Ries, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou, N. Howlader, S. Altekruse, E. Feuer, L. Huang, A. Mariotto, *et al.*, “SEER cancer statistics review, 1975–2006,” *Bethesda, MD: National Cancer Institute*, pp. 2001–23, 2009.
- [3] M. Guerra, C. Gallo, G. Mendonça, and G. Silva, “Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes,” *Rev Bras Cancerol*, vol. 51, no. 3, pp. 227–34, 2005.
- [4] D. Malta, L. Moura, M. Souza, M. Curado, A. Alencar, and G. Alencar, “Tendência da mortalidade por câncer de pulmão, traquéia e brônquios no Brasil, 1980–2003,” *J Bras Pneumol*, vol. 33, no. 5, pp. 536–43, 2007.
- [5] J. Minna, J. Roth, and A. Gazdar, “Focus on lung cancer.,” *Cancer cell*, vol. 1, no. 1, p. 49, 2002.
- [6] C. for Disease Control and Prevention, “<http://www.cdc.gov/>,” 2010.
- [7] P. Vineis, M. Alavanja, P. Buffler, E. Fontham, S. Franceschi, Y. Gao, P. Gupta, A. Hackshaw, E. Matos, J. Samet, *et al.*, “Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, no. 2, p. 99, 2004.
- [8] R. Peto and A. Lopez, “The future world-wide health effects of current smoking patterns,” 2010.
- [9] R. Herbst, J. Heymach, and S. Lippman, “Molecular Origins of Cancer,” *N Engl J Med*, vol. 359, pp. 1367–80, 2008.
- [10] J. D. Patel, “Lung cancer in women.,” *J Clin Oncol*, vol. 23, pp. 3212–3218, May 2005.
- [11] H. Risch, G. Howe, M. Jain, J. Burch, E. Holowaty, and A. Miller, “Are female smokers at higher risk for lung cancer than male smokers?,” *American journal of epidemiology*, vol. 138, no. 5, p. 281, 1993.

- [12] E. Zang and E. Wynder, “Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence,” *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 88, no. 3-4, p. 183, 1996.
- [13] W. Travis, *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Iarc, 2004.
- [14] H. Pass, D. Carbone, D. Johnson, J. Mina, and G. Scagliotti, “Principles and practice of lung cancer,” Fourth edition, 2010.
- [15] R. Darnell and J. Posner, “Paraneoplastic syndromes involving the nervous system,” *New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 16, p. 1543, 2003.
- [16] S. Khuder, “Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis,” *Lung Cancer*, vol. 31, no. 2-3, pp. 139–148, 2001.
- [17] T. Colby, M. Noguchi, C. Henschke, *et al.*, “Adenocarcinoma. WD Travis, E Brambilla, HK Muller-Hermelink, *et al.* Pathology and Genetics, Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart,” 2005.
- [18] S. Spiro and J. Porter, “Lung cancer—where are we today?: Current advances in staging and nonsurgical treatment,” *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 166, no. 9, p. 1166, 2002.
- [19] S. Hammar, C. Brambilla, B. Pugatch, *et al.*, “Tumours of the lung. Squamous cell carcinoma,” *Pathology and genetics: tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC, Lyon*, pp. 26–34, 2004.
- [20] K. Funai, T. Yokose, G. Ishii, K. Araki, J. Yoshida, M. Nishimura, K. Nagai, Y. Nishiwaki, and A. Ochiai, “Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung,” *The American journal of surgical pathology*, vol. 27, no. 7, p. 978, 2003.
- [21] F. Hirsch, M. Varella-Garcia, P. Bunn, M. Di Maria, R. Veve, R. Bremnes, A. Barón, C. Zeng, and W. Franklin, “Epidermal growth factor receptor in non–small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, no. 20, p. 3798, 2003.
- [22] S. Nicholson, M. Beasley, E. Brambilla, P. Hasleton, T. Colby, M. Shepard, R. Falk, and W. Travis, “Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens,” *The American journal of surgical pathology*, vol. 26, no. 9, p. 1184, 2002.

- [23] P. Delgado, M. Jorda, and P. Ganjei-Azar, "Small cell carcinoma versus other lung malignancies," *Cancer Cytopathology*, vol. 90, no. 5, pp. 279–285, 2000.
- [24] M. Mushtaq, "Setting the stage for the new tnm lung,"
- [25] B. Johnson, "Management of small cell lung cancer," *Clinics in chest medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 225–239, 2002.
- [26] D. Giroux, R. Rami-Porta, K. Chansky, J. Crowley, P. Groome, P. Postmus, V. Rusch, J. Sculier, F. Shepherd, L. Sobin, *et al.*, "The IASLC Lung Cancer Staging Project: data elements for the prospective project," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 4, no. 6, p. 679, 2009.
- [27] E. Winer, J. Gralow, L. Diller, B. Karlan, P. Loehrer, L. Pierce, G. Demetri, P. Ganz, B. Kramer, M. Kris, *et al.*, "Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening a report from the American Society of Clinical Oncology," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 5, p. 812, 2009.
- [28] R. Arriagada, B. Bergman, A. Dunant, T. Le Chevalier, J. Pignon, J. Vansteenkiste, *et al.*, "Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer.," *The New England journal of medicine*, vol. 350, no. 4, p. 351, 2004.
- [29] K. Pisters and T. Le Chevalier, "Adjuvant Chemotherapy in Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 14, p. 3270, 2005.
- [30] M. Fukuoka, S. Yano, G. Giaccone, T. Tamura, K. Nakagawa, J. Douillard, Y. Nishiwaki, J. Vansteenkiste, S. Kudoh, D. Rischin, *et al.*, "Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, no. 12, p. 2237, 2003.
- [31] N. Thatcher, A. Chang, P. Parikh, J. Rodrigues Pereira, T. Ciuleanu, J. von Pawel, S. Thongprasert, E. Tan, K. Pemberton, V. Archer, *et al.*, "Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomized, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)," *The Lancet*, vol. 366, no. 9496, pp. 1527–1537, 2005.
- [32] S. Spiro, R. Rudd, R. Souhami, J. Brown, D. Fairlamb, N. Gower, L. Maslove, R. Milroy, V. Napp, M. Parmar, *et al.*, "Chemotherapy

versus supportive care in advanced non-small cell lung cancer: improved survival without detriment to quality of life,” *British Medical Journal*, vol. 59, no. 10, p. 828, 2004.

- [33] A. Sandler, R. Gray, M. Perry, J. Brahmer, J. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum, and D. Johnson, “Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 24, p. 2542, 2006.
- [34] D. Johnson, L. Fehrenbacher, W. Novotny, R. Herbst, J. Nemunaitis, D. Jablons, C. Langer, R. DeVore, J. Gaudreault, L. Damico, *et al.*, “Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 22, no. 11, p. 2184, 2004.
- [35] K. Pandya, *Lung Cancer: Translational and Emerging Therapies*. Informa Healthcare, 2007.
- [36] L. Ding, G. Getz, D. Wheeler, E. Mardis, M. McLellan, K. Cibulskis, C. Sougnez, H. Greulich, D. Muzny, M. Morgan, *et al.*, “Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma,” *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1069–1075, 2008.
- [37] L. Chirieac and S. Dacic, “Targeted Therapies in Lung Cancer,” *Surgical Pathology Clinics*, vol. 3, no. 1, pp. 71–82, 2010.
- [38] I. Wistuba, A. Gazdar, and J. Minna, “Molecular genetics of small cell lung carcinoma\* 1,” in *Seminars in oncology*, vol. 28, pp. 3–13, Elsevier, 2001.
- [39] S. Spiro, L. James, R. Rudd, C. Trask, J. Tobias, M. Snee, D. Gilligan, P. Murray, M. de Elvira, K. O’Donnell, *et al.*, “Early compared with late radiotherapy in combined modality treatment for limited disease small-cell lung cancer: a London Lung Cancer Group multicenter randomized clinical trial and meta-analysis,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 24, p. 3823, 2006.
- [40] A. Auperin, R. Arriagada, J. Pignon, C. Le Pechoux, A. Gregor, R. Stephens, P. Kristjansen, B. Johnson, H. Ueoka, H. Wagner, *et al.*, “Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission,” *New England Journal of Medicine*, vol. 341, no. 7, p. 476, 1999.

- [41] G. da Cunha Santos, F. A. Shepherd, and M. S. Tsao, "Egfr mutations and lung cancer.," *Annu Rev Pathol*, Jan 2010.
- [42] Y. Mosesson and Y. Yarden, "Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy," in *Seminars in cancer biology*, vol. 14, pp. 262–270, Elsevier, 2004.
- [43] K. Inamura, H. Ninomiya, Y. Ishikawa, and O. Matsubara, "Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features?," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 134, pp. 66–72, Jan 2010.
- [44] V. Miller, G. Riely, M. Zakowski, A. Li, J. Patel, R. Heelan, M. Kris, A. Sandler, D. Carbone, A. Tsao, *et al.*, "Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 9, p. 1472, 2008.
- [45] Y. Kim, G. Ishii, K. Goto, K. Nagai, K. Tsuta, S. Shiono, J. Nitadori, T. Kodama, Y. Nishiwaki, and A. Ochiai, "Dominant papillary subtype is a significant predictor of the response to gefitinib in adenocarcinoma of the lung," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 21, p. 7311, 2004.
- [46] N. Motoi, J. Szoke, G. Riely, V. Seshan, M. Kris, V. Rusch, W. Gerald, and W. Travis, "Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis," *The American journal of surgical pathology*, vol. 32, no. 6, p. 810, 2008.
- [47] D. Eberhard, B. Johnson, L. Amler, A. Goddard, S. Heldens, R. Herbst, W. Ince, P. J "anne, T. Januario, D. Johnson, *et al.*, "Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non–small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 25, p. 5900, 2005.
- [48] H. Sasaki, S. Shimizu, K. Endo, M. Takada, M. Kawahara, H. Tanaka, A. Matsumura, K. Iuchi, H. Haneda, E. Suzuki, *et al.*, "EGFR and erbB2 mutation status in Japanese lung cancer patients," *International Journal of Cancer*, vol. 118, no. 1, pp. 180–184, 2006.

- [49] L. Sholl, B. Yeap, A. Iafrate, A. Holmes-Tisch, Y. Chou, M. Wu, Y. Goan, L. Su, E. Benedettini, J. Yu, *et al.*, “Lung adenocarcinoma with EGFR amplification has distinct clinicopathologic and molecular features in never-smokers,” *Cancer research*, vol. 69, no. 21, p. 8341, 2009.
- [50] T. John, G. Liu, and M. Tsao, “Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors,” *Oncogene*, vol. 28, pp. S14–S23, 2009.
- [51] M. Tsao, A. Sakurada, J. Cutz, C. Zhu, S. Kamel-Reid, J. Squire, I. Lorimer, T. Zhang, N. Liu, M. Daneshmand, *et al.*, “Erlotinib in lung cancer—molecular and clinical predictors of outcome,” *New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 2, p. 133, 2005.
- [52] G. Riely, J. Marks, and W. Pao, “KRAS mutations in non-small cell lung cancer,” in *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 6, p. 201, Am Thoracic Soc, 2009.
- [53] A. Marchetti, F. Buttitta, S. Pelegri, A. Chella, Bertacca, *et al.*, “Bronchioloalveolar lung carcinomas: K-ras mutations are constant events in the mucinous subtype,” *The Journal of Pathology*, vol. 179, no. 3, pp. 254–259, 1996.
- [54] K. Okudela, T. Woo, and H. Kitamura, “KRAS gene mutations in lung cancer: Particulars established and issues unresolved,” *Pathology International*.
- [55] C. Mascaux, N. Iannino, B. Martin, M. Paesmans, T. Berghmans, M. Dusart, A. Haller, P. Lothaire, A. Meert, S. Noel, *et al.*, “The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis,” *British journal of cancer*, vol. 92, no. 1, pp. 131–139, 2004.
- [56] J. Paez, P. Janne, J. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. Kaye, N. Lindeman, T. Boggon, *et al.*, “EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy,” *Science*, vol. 304, no. 5676, p. 1497, 2004.
- [57] Y. Loriot, P. Mordant, E. Deutsch, K. Olaussen, and J. Soria *Nature Reviews Clinical Oncology*, no. 9.

- [58] M. Soda, Y. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, *et al.*, “Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer,” *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 561–566, 2007.
- [59] M. Martelli, G. Sozzi, L. Hernandez, V. Pettirossi, A. Navarro, D. Conte, P. Gasparini, F. Perrone, P. Modena, U. Pastorino, *et al.*, “EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues,” *American Journal of Pathology*, vol. 174, no. 2, p. 661, 2009.
- [60] M. Mino-Kenudson, L. Chirieac, K. Law, J. Hornick, N. Lindeman, E. Mark, D. Cohen, B. Johnson, P. J. “anne, A. Iafrate, *et al.*, “A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry,” *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 5, p. 1561, 2010.
- [61] T. Mitsudomi, Y. Yatabe, T. Koshikawa, S. Hatooka, M. Shinoda, M. Suyama, T. Sugiura, M. Ogawa, and T. Takahashi, “Mutations of the P53 tumor suppressor gene as clonal marker for multiple primary lung cancers,” *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 114, no. 3, pp. 354–360, 1997.
- [62] A. Anastasi, V. Erspamer, and M. Bucci, “Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 27, no. 2, pp. 166–167, 1971.
- [63] T. Moody, V. Bertness, and D. Carney, “Bombesin-like peptides and receptors in human tumor cell lines,” *Peptides*, vol. 4, no. 5, pp. 683–686, 1983.
- [64] M. Sunday, “Tissue-specific expression of the mammalian bombesin gene,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 547, no. Bombesin-Like Peptides in Health and Disease, pp. 95–113, 1988.
- [65] O. Patel, A. Shulkes, and G. S. Baldwin, “Gastrin-releasing peptide and cancer,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1766, pp. 23–41, Aug 2006.
- [66] H. C. Weber, “Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects,” *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, vol. 16, pp. 66–71, Feb 2009.

- [67] Y. Sun and Z. Chen, “A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord,” *Nature*, vol. 448, no. 7154, pp. 700–703, 2007.
- [68] H. Sakamoto, “The gastrin-releasing peptide system in the spinal cord mediates masculine sexual function,” *Anatomical Science International*, pp. 1–11.
- [69] C. Liebmann, “EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010.
- [70] R. T. Dorsam and J. S. Gutkind, “G-protein-coupled receptors and cancer.,” *Nat Rev Cancer*, vol. 7, pp. 79–94, Feb 2007.
- [71] Q. Zhang, N. E. Bhola, V. W. Y. Lui, D. R. Siwak, S. M. Thomas, C. T. Gubish, J. M. Siegfried, G. B. Mills, D. Shin, and J. R. Grandis, “Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer.,” *Mol Cancer Ther*, vol. 6, pp. 1414–1424, Apr 2007.
- [72] V. W. Y. Lui, S. M. Thomas, Q. Zhang, A. L. Wentzel, J. M. Siegfried, J. Y. Li, and J. R. Grandis, “Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor.,” *Oncogene*, vol. 22, pp. 6183–6193, Sep 2003.
- [73] S. M. Thomas, J. R. Grandis, A. L. Wentzel, W. E. Gooding, V. W. Y. Lui, and J. M. Siegfried, “Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells.,” *Neoplasia*, vol. 7, pp. 426–431, Apr 2005.
- [74] X. Qu, D. Xiao, and H. Weber, “Biologic relevance of mammalian bombesin-like peptides and their receptors in human malignancies,” *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 10, no. 1, p. 60, 2003.
- [75] E. Rozengurt, “Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors,” *Journal of cellular physiology*, vol. 213, no. 3, pp. 589–602, 2007.
- [76] O. Fischer, S. Hart, A. Gschwind, and A. Ullrich, “EGFR signal transactivation in cancer cells,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, pp. 1203–1208, 2003.



- [77] M. Koppán, G. Halmos, J. M. Arencibia, N. Lamharzi, and A. V. Schally, “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*, vol. 83, pp. 1335–1343, Oct 1998.
- [78] Q. Zhang, S. M. Thomas, S. Xi, T. E. Smithgall, J. M. Siegfried, J. Kamens, W. E. Gooding, and J. R. Grandis, “Src family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells.,” *Cancer Res*, vol. 64, pp. 6166–6173, Sep 2004.
- [79] X. Liu, D. L. Carlisle, M. C. Swick, A. Gaither-Davis, J. R. Grandis, and J. M. Siegfried, “Gastrin-releasing peptide activates akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib.,” *Exp Cell Res*, vol. 313, pp. 1361–1372, Apr 2007.
- [80] R. Seethala, W. Gooding, P. Handler, B. Collins, Q. Zhang, J. Siegfried, and J. Grandis, “Immunohistochemical analysis of phosphotyrosine signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor autocrine signaling pathways in head and neck cancers and metastatic lymph nodes,” *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5, p. 1303, 2008.
- [81] F. Cuttitta, D. Carney, J. Mulshine, T. Moody, J. Fedorko, A. Fischler, and J. Minna, “Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer,” 1985.
- [82] J. Gosney, M. Sissons, and R. Allibone, “Neuroendocrine cell populations in normal human lungs: a quantitative study.,” *Thorax*, vol. 43, no. 11, p. 878, 1988.
- [83] X. Li, Y. Lv, A. Yuan, and Z. Li, “Gastrin-releasing peptide links stressor to cancer progression.,” *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 136, pp. 483–491, Apr 2010.
- [84] S. Preston, L. Woodhouse, S. Jones-Blackett, G. Miller, and J. Primrose, “High-affinity binding sites for gastrin-releasing peptide on human colorectal cancer tissue but not uninvolved mucosa.,” *British journal of cancer*, vol. 71, no. 5, p. 1087, 1995.
- [85] R. Carroll, K. Matkowskyj, S. Chakrabarti, T. McDonald, and R. Benya, “Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its re-

- ceptor by well-differentiated colon cancers in humans,” *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 276, no. 3, p. G655, 1999.
- [86] C. A. Rivera, N. C. Ahlberg, L. Taglia, M. Kumar, A. Blunier, and R. V. Benya, “Expression of grp and its receptor is associated with improved survival in patients with colon cancer,” *Clin Exp Metastasis*, vol. 26, no. 7, pp. 663–671, 2009.
- [87] R. Markwalder and J. Reubi, “Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate,” *Cancer research*, vol. 59, no. 5, p. 1152, 1999.
- [88] C. Constantinides, A. C. Lazaris, K. N. Haritopoulos, D. Pantazopoulos, M. Chrisofos, and A. Giannopoulos, “Immunohistochemical detection of gastrin releasing peptide in patients with prostate cancer,” *World J Urol*, vol. 21, pp. 183–187, Aug 2003.
- [89] H. Ananias, M. van den Heuvel, W. Helfrich, and I. de Jong, “Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer,” *The Prostate*, vol. 69, no. 10, pp. 1101–1108, 2009.
- [90] M. Gugger and J. Reubi, “Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast,” *American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 6, p. 2067, 1999.
- [91] C. Van de Wiele, P. Phonteyne, P. Pauwels, I. Goethals, R. Van den Broecke, V. Cocquyt, and R. Dierckx, “Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 49, no. 2, p. 260, 2008.
- [92] D. G. Flores, L. Meurer, A. F. Uberti, B. R. Macedo, G. Lenz, A. L. Brunetto, G. Schwartsmann, and R. Roesler, “Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain,” *Brain Res Bull*, vol. 82, pp. 95–98, Apr 2010.
- [93] J. Qiao, J. Kang, T. A. Ishola, P. G. Rychahou, B. M. Evers, and D. H. Chung, “Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 12891–12896, Sep 2008.

- [94] M. N. Lango, K. F. Dyer, V. W. Y. Lui, W. E. Gooding, C. Gubish, J. M. Siegfried, and J. R. Grandis, “Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck.,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 94, pp. 375–383, Mar 2002.
- [95] K. Szepesházi, G. Halmos, A. Schally, J. Arencibia, K. Groot, M. Vadillo-Buenfil, and E. Rodriguez-Martin, “Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptors during therapy with hormonal peptide analogs,” *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 125, no. 8, pp. 444–452, 1999.
- [96] G. Halmos and A. Schally, “Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 3, p. 956, 1997.
- [97] A. Stangelberger, A. V. Schally, J. L. Varga, B. D. Hammann, K. Groot, G. Halmos, R.-Z. Cai, and M. Zarandi, “Antagonists of growth hormone releasing hormone (ghrh) and of bombesin/gastrin releasing peptide (bn/grp) suppress the expression of vegf, bfgf, and receptors of the egf/her family in pc-3 and du-145 human androgen-independent prostate cancers.,” *Prostate*, vol. 64, pp. 303–315, Aug 2005.
- [98] Z. Kahán, B. Sun, A. Schally, J. Arencibia, R. Cai, K. Groot, and G. Halmos, “Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast carcinoma by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II,” *Cancer*, vol. 88, no. 6, pp. 1384–1392, 2000.
- [99] A. Bajo, A. Schally, K. Groot, and K. Szepeshazi, “Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers,” *British journal of cancer*, vol. 90, no. 1, pp. 245–252, 2004.
- [100] J. Layton, D. Scanlon, C. Soveny, and G. Morstyn, “Effects of bombesin antagonists on the growth of small cell lung cancer cells in vitro,” *Cancer research*, vol. 48, no. 17, p. 4783, 1988.
- [101] S. Langdon, T. Sethi, A. Ritchie, M. Muir, J. Smyth, and E. Rozengurt, “Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo,” *Cancer research*, vol. 52, no. 16, p. 4554, 1992.

- [102] G. Schwartzmann, L. DiLeone, M. Horowitz, D. Schunemann, A. Cancelli, A. Pereira, M. Richter, F. Souza, A. da Rocha, F. Souza, *et al.*, “A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies,” *Investigational new drugs*, vol. 24, no. 5, pp. 403–412, 2006.
- [103] M. Sunday, J. Hua, H. Dai, A. Nusrat, and J. Torday, “Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture.,” *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 3, no. 3, p. 199, 1990.
- [104] L. Shan, R. Emanuel, D. Dewald, J. Torday, N. Asokanathan, K. Wada, E. Wada, and M. Sunday, “Bombesin-like peptide receptor gene expression, regulation, and function in fetal murine lung,” *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 286, no. 1, p. 165, 2004.
- [105] L. Shan, R. L. Emanuel, D. Dewald, J. S. Torday, N. Asokanathan, K. Wada, E. Wada, and M. E. Sunday, “Bombesin-like peptide receptor gene expression, regulation, and function in fetal murine lung.,” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 286, pp. L165–L173, Jan 2004.
- [106] R. Alexander, J. Upp, G. Poston, V. Gupta, C. Townsend, and J. Thompson, “Effects of bombesin on growth of human small cell lung carcinoma in vivo,” *Cancer research*, vol. 48, no. 6, p. 1439, 1988.
- [107] T. Moody, C. Pert, A. Gazdar, D. Carney, and J. Minna, “High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma.,” *Science (New York, NY)*, vol. 214, no. 4526, p. 1246, 1981.
- [108] K. Yamaguchi, K. Abe, T. Kameya, I. Adachi, S. Taguchi, K. Otsubo, and N. Yanaihara, “Production and Molecular Size Heterogeneity of Immunoreactive Gastrinreleasing Peptide in Fetal and Adult Lungs and Primary Lung Tumors,” *Cancer research*, vol. 43, no. 8, p. 3932, 1983.
- [109] K. Abe, I. Adachi, S. Miyakawa, M. Tanaka, K. Yamaguchi, N. Tanaka, T. Kameya, and Y. Shimosato, “Production of calcitonin, adrenocorticotrophic hormone, and  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone in tumors derived from amine precursor uptake and decarboxylation cells,” *Cancer Research*, vol. 37, no. 11, p. 4190, 1977.

- [110] S. Baylin and G. Mendelsohn, "Ectopic (inappropriate) hormone production by tumors: mechanisms involved and the biological and clinical implications," *Endocrine Reviews*, vol. 1, no. 1, p. 45, 1980.
- [111] G. Goodwin, J. Shaper, M. Abeloff, G. Mendelsohn, and S. Baylin, "Analysis of cell surface proteins delineates a differentiation pathway linking endocrine and nonendocrine human lung cancers," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, no. 12, p. 3807, 1983.
- [112] J. Siegfried, Y. Han, M. DeMichele, J. Hunt, A. Gaither, and F. Cuttitta, "Production of gastrin-releasing peptide by a non-small cell lung carcinoma cell line adapted to serum-free and growth factor-free conditions.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 11, p. 8596, 1994.
- [113] M. Sunday, N. Choi, E. Spindel, W. Chin, and E. Mark, "Gastrin-releasing peptide gene expression in small cell and large cell undifferentiated lung carcinomas," *Human pathology*, vol. 22, no. 10, pp. 1030–1039, 1991.
- [114] A. Frankel, M. S. Tsao, and J. Viallet, "Receptor subtype expression and responsiveness to bombesin in cultured human bronchial epithelial cells.," *Cancer Res*, vol. 54, pp. 1613–1616, Apr 1994.
- [115] S. Degan, G. Y. Lopez, K. Kevill, and M. E. Sunday, "Gastrin-releasing peptide, immune responses, and lung disease.," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1144, pp. 136–147, Nov 2008.
- [116] S. Aguayo, M. Kane, T. King Jr, M. Schwarz, L. Grauer, and Y. Miller, "Increased levels of bombesin-like peptides in the lower respiratory tract of asymptomatic cigarette smokers.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 84, no. 4, p. 1105, 1989.
- [117] S. P. Shriver, H. A. Bourdeau, C. T. Gubish, D. L. Tirpak, A. L. Davis, J. D. Luketich, and J. M. Siegfried, "Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 92, pp. 24–33, Jan 2000.
- [118] J. Patel, P. Bach, and M. Kris, "Lung cancer in US women: a contemporary epidemic," *Jama*, vol. 291, no. 14, p. 1763, 2004.

- [119] Y. Miyake, T. Kodama, and K. Yamaguchi, "Pro-gastrin-releasing peptide (31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma," *Cancer research*, vol. 54, no. 8, p. 2136, 1994.
- [120] N. Sunaga, S. Tsuchiya, K. Minato, S. Watanabe, N. Fueki, H. Hoshino, T. Makimoto, S. Ishihara, R. Saito, and M. Mori, "Serum pro-gastrin-releasing peptide is a useful marker for treatment monitoring and survival in small-cell lung cancer," *Oncology*, vol. 57, no. 2, pp. 143–148, 2000.
- [121] K. Yamaguchi, K. Aoyagi, K. Urakami, T. Fukutani, N. Maki, S. Yamamoto, K. Otsubo, Y. Miyake, and T. Kodama, "Enzyme-linked Immunosorbent Assay of Pro-gastrin-releasing Peptide for Small Cell Lung Cancer Patients in Comparison with Neuron-specific Enolase Measurement," *Cancer Science*, vol. 86, no. 7, pp. 698–705, 1995.
- [122] R. Molina, S. Holdenrieder, J. Auge, A. Schalhorn, R. Hatz, and P. Stieber, "Diagnostic relevance of circulating biomarkers in patients with lung cancer," *Cancer Biomarkers*, vol. 6, no. 3, pp. 163–178, 2009.
- [123] T. Hirose, K. Okuda, T. Yamaoka, K. Ishida, S. Kusumoto, T. Sugiyama, T. Shirai, T. Ohnshi, T. Ohmori, and M. Adachi, "Are levels of pro-gastrin-releasing peptide or neuron-specific enolase at relapse prognostic factors after relapse in patients with small-cell lung cancer?," *Lung Cancer*, 2010.
- [124] R. Molina, X. Filella, and J. Auge, "ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer," *Clinical biochemistry*, vol. 37, no. 7, pp. 505–511, 2004.
- [125] J. R. Grandis, A. Chakraborty, M. F. Melhem, Q. Zeng, and D. J. Tweardy, "Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells," *Oncogene*, vol. 15, pp. 409–416, Jul 1997.

## 9.1 Apêndice A - Artigo Científico

## **Gastrin-releasing peptide receptor expression in lung cancer**

Mattei J<sup>1</sup>, Achcar RD<sup>2</sup>, Cano CH<sup>3</sup>, Macedo B<sup>4</sup>, Meurer L<sup>4</sup>, Kulczynski JM<sup>4</sup>, Hirsch F<sup>5</sup>,  
Roesler, R<sup>6</sup>, Brunetto, AT<sup>6</sup>, Schwartsmann G<sup>6</sup>

1- PhD student of Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul and Colorado University, Denver, Colorado, USA

2- Department of Patology, National Jewish Hospital, Denver, Colorado, USA

3- PhD student of Medical Oncology Department of Colorado University, Denver, Colorado, USA

4-Department of Patology, Academic Hospital (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

5- Department of Medical Oncology, Colorado University, Denver, Colorado, USA

6-Department of Medical Oncology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Correspondence to:

Jane Mattei, MD  
Postgraduated Course in Medicine,  
Faculty of Medicine,  
Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil  
Rua Ramiro Barcelos 2350/sala 399  
Porto Alegre, RS, Brazil  
CP 90035903  
Email: janemattei@gmail.com



## **Abstract**

**Background:** Gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) are overexpressed in several neoplasms and can play a critical role in tumor cell survival, proliferation, migration and invasion in preclinical models. A Phase I trial of RC-3095, a synthetic GRPR antagonist, conducted by our group, showed no significant dose-limiting toxicities with evidence of target modulation and antitumor activity. For the development of Phase II clinical trials program of RC-3095, candidate tumor types are being selected on basis of GRPR expression. Data on GRPR expression in lung cancer is currently limited.

**Methods:** We analysed the expression of GRPR receptors in tumor tissue obtained from biopsies of patients with lung cancer from our institution during the period from 2004 to 2008 using standard immunohistochemistry techniques. Our aim was two-fold: (1) to determine GRPR expression in both non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC); (2) to correlate its expression with clinical stages and demographic variables using standard univariate analysis. Normal lung tissue from necropsy were used as a control.

**Results:** GRPR expression was higher in NSCLC (n=200) compared to SCLC (n=38), p=0,3. In NSCLC, GRPR expression was absent, weak,

moderate and strong in 28%, 48%, 16.5% and 7.5% of samples, respectively. In contrast, GRPR expression was absent, weak, moderate and strong in 47.38%, 34.21%, 15.78% and 2.63% of SCLC tumor samples, respectively. Looking at the NSCLC histological subtypes, a higher percentage of samples showing strong expression was observed in adenocarcinomas (10%) although not statistically significant ( $p=0.673$ ). Strong GRPR expression was more pronounced in samples obtained from patients with NSCLC at advanced stages (III and IV) in comparison with samples obtained from patients presenting at earlier clinical stages ( $p=0.01$ ). In a control group of lung tissues without tumor ( $n=23$ ), GRPR expression was absent or very low ( $p=0.049$ ).

**Conclusions:** This is the first study to demonstrate that significant levels of GRPR expression can be found in all histological subtypes of lung cancer. Furthermore, GRPR is differently expressed according to clinical stages of lung cancer. These findings support previous observations suggesting that GRPR may represent a potential target for development of a new treatment approaches against lung cancer.

**Keywords:** Lung cancer; Gastrin-releasing peptide receptor; Biomarkers

## 1 Introduction

Lung cancer is the leading cause of global cancer death; and it is responsible for more than 1 million deaths per year (1,2). At diagnosis, around 75% of lung cancer patients present with locally advanced or metastatic disease (3). Treatment for these patients is mainly

palliative and consists of chemotherapy alone or in combination with irradiation and biological agents (4).

Despite recent advances in understanding the biology of lung cancer, patients with metastatic disease still have a limited median survival of only 4 to 6 months with current therapies; therefore, new therapeutic targets are needed to improve survival rates (4,5) .

Bombesin/Gastrin-Releasing Peptides Receptors (GRPR) are expressed in a variety of human cancer cells such as prostate, breast, colon (1,6,7). In our laboratory, we were also able to demonstrate tha GRPR are highly expressed in tumor samples obtained from patients with cervical cancer (8) and gliomas (9).

In the last two decades, several lines of experimental evidence have suggested that this growth factor is involved in many steps of tumor progression, enhancing angiogenesis, local invasion and distant metastasis (1,6,7,8,9).

GRPs play important physiological roles in the regulation of smooth muscle contraction, the release of hormones in the gastrointestinal tract, the secretion of pancreatic enzymes, and can also serve as neurotransmitters in the central nervous system (1,6,10,11).

GRPR receptors could be an attractive target for cancer treatment, because these expression can be found more commonly in human malignancies as compared to normal human tissues (1,8,9). GRPR synthetic antagonists, such as RC3095, have been developed as anticancer candidate compounds, and showed antitumor activity both *in vitro* and *in vivo* (1,10,11,12). In a Phase I trial of RC-3095 conducted at our institutio, including 25 patients with advanced refractory solid malignancies, RC-3095 was shown to be well tolerated with detectable dose-limiting toxicities (13). Notably, evidence of antitumor activity was documented in three patients whose tumors exhibited a high GRPR expression.

GRP was shown to act as an autocrine growth factor, promoting proliferation in SCLC cells (14). In NSCLC and in head and neck neoplasm, GRPR contributes to increase

proliferation, by triggering the activation of EGFR in the cell surface (15) (16) (17). In contrast, GRPR antagonists might severely limit the autocrine release of EGFR ligands in NSCLC (18).

In the near future, our group will launch a series of Phase II trials of RC3095 in patients with specific advanced malignancies. For the planning of these studies, additional information on the differential expression of GRPR in normal versus neoplastic lung tissues, as well as its relation to clinical stage and overall survival, are of great importance.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Population:**

All cases of lung cancer from pathology records of the Pathology Department, Academic Hospital (HCPA), and Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, during period between 2004 to 2008. About 92 patients were excluded from analysis for the following reasons: insufficient material for immunohistochemistry and necrosis in almost all sample. Clinico-pathologic variables collected retrospectively from hospital electronic database and medical records were: tumor type, age, gender, stage I to IV (NSCLC) and Limited Disease and Extensive Disease (SCLC), smoking status (smoker vs. non-smokers), and overall survival (date of diagnosis to date of death).

### **2.2 Immunohistochemistry Technique:**

Immunohistochemical stains were performed on all cases as follows: specimens previously fixed in paraffin-embedded blocks were freshly sectioned at a thickness of 4 microm and mounted on slides for immunohistochemistry. The primary antibody used was rabbit polyclonal antibody anti-GRPR (OPA1-15619 by Bioreagents, EUA) at a 1/200 dilution.

After dewaxing, inactivating endogenous peroxidase activity and blocking cross-reaction with normal serum, 4- microm sections were incubated overnight at 4°C with a diluted solution of primary antibody. Identification of primary location was achieved by subsequent application of biotinylated antibody, strptavidin horseradish peroxidase conjugate (LSAB, Dako) and diaminobenzidine tetrahydrochloride/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kit DAB, DakoStaining). Images were obtained with a scanscope connected to a personal computer HP *xw 4300 Workstation* (Hewlett-Packard Development Co, LP, Palo Alto, Calif). Representative photographs were taken to illustrate the findings.

### **2.3 Immunohistochemistry Evaluation:**

Grading of immunostained tissue samples involved examination of malignant cells. Five malignant cells clusters per slide, identified under high power (x 40), were scored for intensity and percentage of staining of cells, and the mean of the 5 intensities for each cluster was recorded. The mean values per case were averaged and computed for each diagnostic group. Representative photographs were taken to illustrate the findings.

The following interpretation of the staining pattern was used to determine positivity: GRPR (cytoplasmic expression). Figure 1, A through C.

Tissue of archival cases of NSCLC and SCLC were evaluated. Each case had 1 slide of tissue stained for the marker evaluated, and each slide was scored separately for intensity and percentage of tumor cells stained. Intensity positivity of tumor was recorded on a scale of 0 to 3 (0= no expression; 1= mild expression; 2=moderate expression and 3=intense expression). Percentage of cells positivity was recorded on a scale of 0 to 3 (0=no expression; 1=less than 25% of cells; 2= 25 to 50% of cells; 3=50 to 100% of cells). See Fig 2.

Nonneoplastic lung tissues were used as controls and the results are expressed in the same way of intensity and frequency as tumors samples.

## **2.4 Statistical Analysis:**

The significance of differences observed between groups was calculated using Statistical Package for Social Sciences, SPSS version 17.0. Correlation between GRPR expression and clinico-pathologic variables was analyzed by using performed using Pearson Chi-square Test and Fisher Exact Test. Overall survival was calculated by the Kaplan-Meier method and differences between groups were assessed by the log-rank test and Fishers exact test. Patients were censored for survival at last follow-up visit. A multivariate analysis, using Cox's proportional hazards model was also performed in order to adjust for the effects of age, gender and stage of disease. Statistical differences were accepted at  $p < 0.05$  and were two-sided.

The study proposal was reviewed and approved by institutional audit committee.

## **3. Results**

### **3.1 Patient Demographics**

The tumor specimens were obtained from patients with adenocarcinoma (n=100), squamous cell carcinoma (n=71), large cell carcinoma (n=29) and small cell carcinoma (n=38). The mean survival at diagnosis were 10.03 months, and the male-female ratio was 1.2:1. Review of the available data showed that 200 (84.03%) patients were smokers, 8 (3.36%) were non-smokers, and 30 (12.63%) had unknown smoking status; Patients with NSCLC, 37 (15.54%) were stage I & II, 53 (22.6%) stage III, and 102 (42.85%) stage IV; patients with SCLC, 3 (1.26%) were Limited Disease and 37 (15.54%) Extensive Disease, 6 (2.52%) had unknown ; and 10.3 months was average survival in all population, being were 10.3 months in females and 10.02 months in men. Clinical data are summarized in Table 1.

### **3.2 GRPR Expression in Non-Neoplastic Lung Cancer**

Control samples in non-neoplastic lung tissue from necropsies were compared to cancer lung samples for GRPR expression from patients with the following diseases: asthma, hypovolemic shock, bronchopneumonia, stroke, sepsis, congestive, cardiac insufficiency, and ischemic cardiopathy. Results showed absent GRPR moderate and strong expression in control group compared with lung tumor tissue. The differences were statistically significant ( $p=0.049$ ). See values in the Fig 5.

### **3.3 GRPR Expression & Clinical Stage**

When GRPR expression was evaluated in relation to Clinical Stage the GRPR expression was almost two times more absent in early stages I & II (62.16%) compared with patients with advanced disease (34% for clinical stage III, 32.35% clinical stage IV and 43% Extensive Disease). Strong expression was more pronounced in clinical stage IV (6.9%), clinical stage III (9.43%) and extensive disease (5.4%). Was not founded any patient strong GRPR expression in clinical stage I & II. A conspicuous expression of moderate intensity were much more common in EC IV and ED than other clinical stages. There is a statistically significant association between strong intensity grading scores for GRPR expression analysed by immunohistochemistry in higher clinical stages, unrespective of tumour histology ( $p=0.01$ ).

In SCLC, values of GRPR were shown only in advanced disease because in overall patient samples, only three cases were Small Cell Lung cancer Limited Disease. See in Fig 4.

### **3.2 GRPR Expression & Histological Type**

Overall GRPR expression was similar between NSCLC (72%) and SCLC (52.63%). However, when intensities of GRPR were separated between histologies we observed a

difference in grades of intensity of GRPR between SCLC and NSCLC, although not reaching statistical significance ( $p=0,3$ ). For weak, moderate and strong GRPR expression were pronounced in NSCLC (48% weak; 16.5% moderate; 7.5% strong) compared to SCLC (34.21% weak; 15.78% moderate; 2.63% strong). Even though the conspicuous expression was more important in strong GRPR expression. See values in Fig 3.

Further analysis of histologies of the NSCLC cell lines, showed that GRPR weak expression was similar among histology types. Next graduations of GRPR expression, were founded strong GRPR expression in adenocarcinomas 10%, squamous 4,22% and large cells 6.89%. For moderate expression, 16% in adenocarcinomas, 11,26% squamous, 10.34% in large cells. These results were not statistically significant ( $p=0,673$ ). See values in Fig 4.

### **3.5 Survival Distributions:**

238 patients patients were evaluated for overall survival (OS) and complete information was available for all. This analysis did not reveal any difference in patient survival between those whose tumors did or did not express GRPR/GRPR. This analysis was adjusted for clinical stage.

Furthermore no significant association was seen when comparing GRPR expression between any other demographic variables (smokers, gender and age).

## **4. Discussion**

GRPR expression has been documented in many tumors such as breast, prostate, gliomas, uterine cervix (19) (20) (21) (22). However, consistent data on GRPR expression in lung cancer is still limited. *In vitro* studies have demonstrated that GRPR mRNA levels are present at highest level in mid-gestation human fetal lung (23) (24). This suggests that GRPR may play an important function in cell growth and cell differentiation mainly of type II pneumocyte (25).



In cultures of human normal bronchial epithelium, a low level of GRPR expression was observed (27). In these cells, bombesin was not able to trigger the release of intracellular calcium, or to stimulate the growth. In contrast, in lung cancer cells, there was a greater responsiveness to bombesin (7, 27).

In our analysis, we compared GRPR expression in lung carcinomas and in control samples of lung without neoplasia. We were able to show that normal lung tissue expressed low level of GRPR, as compared to lung cancer samples. According previous reports, GRPR expression was present in up to 70% of small cell lung cancer and much less frequently in NSCLC (about 10-20%) (28) (29). In our analysis, we found a higher intensity of GRPR expression in NSCLC as compared to SCLC, although these results were not statistically significant ( $p=0.3$ ). Notably, the high GRPR expression in adenocarcinomas was of potential therapeutic interest.

GRPR distribution in clinical stages of lung cancer has not been evaluated by previous studies. We observed that GRPR expression was more pronounced in tumors at a more advanced stage, these differences being statistically significant ( $p= 0.041$ ). In the early stages, lack of GRPR expression was documented in more than half of patients (62%). Moreover, no strong GRPR expression was observed in these group of patients. The impact of GRPR expression in patient prognosis deserves future studies.

A number of studies have shown sex-related differences in lung cancer (30, (31). In one study, GRPR mRNA expression was more pronounced in female smokers as compared to males who smoked the same amount of cigarettes (75% vs. 25%) (31). In our study, we could not confirm this observation.

In summary, this is the first study that evaluated GRPR expression in a large sample of patients with lung cancer. In contrast to previous reports suggesting a high GRPR expression in SCLC, our series revealed a more pronounced GRPR expression in samples obtained from

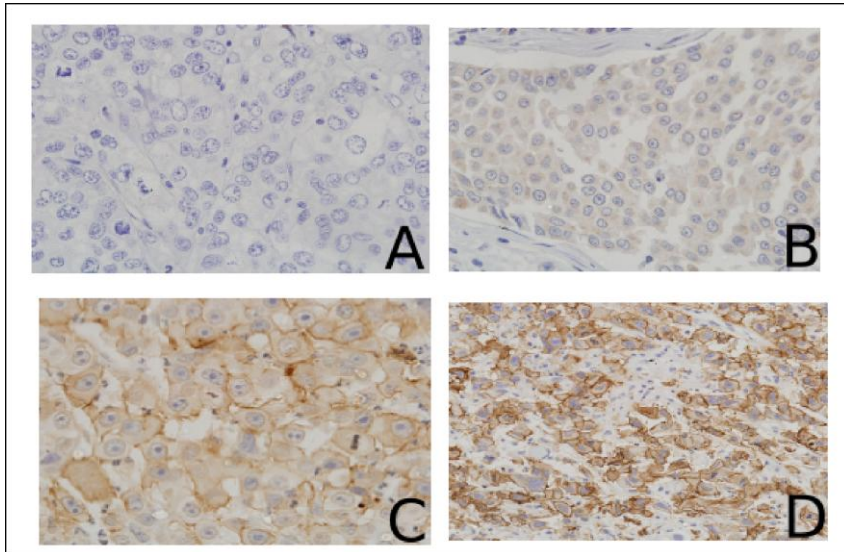
patients with NCSLC. These findings will be taken into consideration in the design of our future Phase II trials of the GRPR antagonist RC- 3095.

**Table 1: Clinical and Demographic Characteristics of Patients (n=238)**

<b>Characteristic</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Mean</b>
<b>Sex</b>			
Female	109	44.9	
Male	132	55.1	
<b>Age at diagnosis</b>			
Female			63.08 yr
Male			61.08 yr
<b>Tabagism</b>			
Ever Smoker	200	84.03	
Never smoker	8	3.36	
Missing	30	12.6	
<b>Histology</b>			
<b>NSCLC</b>	200	84.03	
Adenocarcinoma	100	42.01	
Squamous	71	29.83	
Large Cell	29	12.18	
<b>SCLC</b>	38	15.96	
<b>Disease Stage %</b>			
I and II	37	15.54	
III	53	22.26	
IV	102	42.85	
Limited Disease	3	1.26	
Extensive Disease	37	15.54	
<b>Survival</b>			
Female			10.03 m
Male			10.65 m
Female			10.02 m

y=years

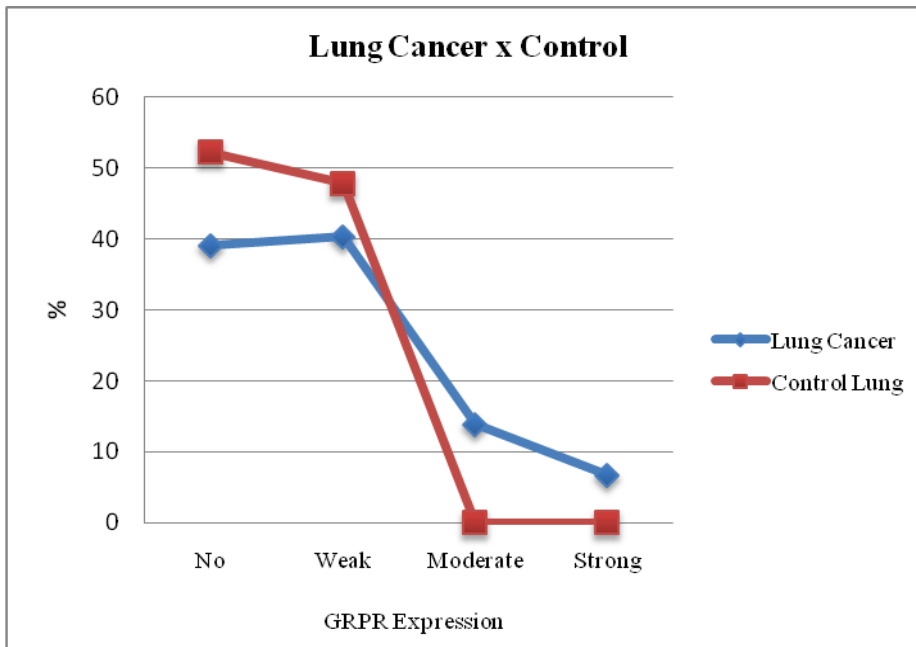
m=months



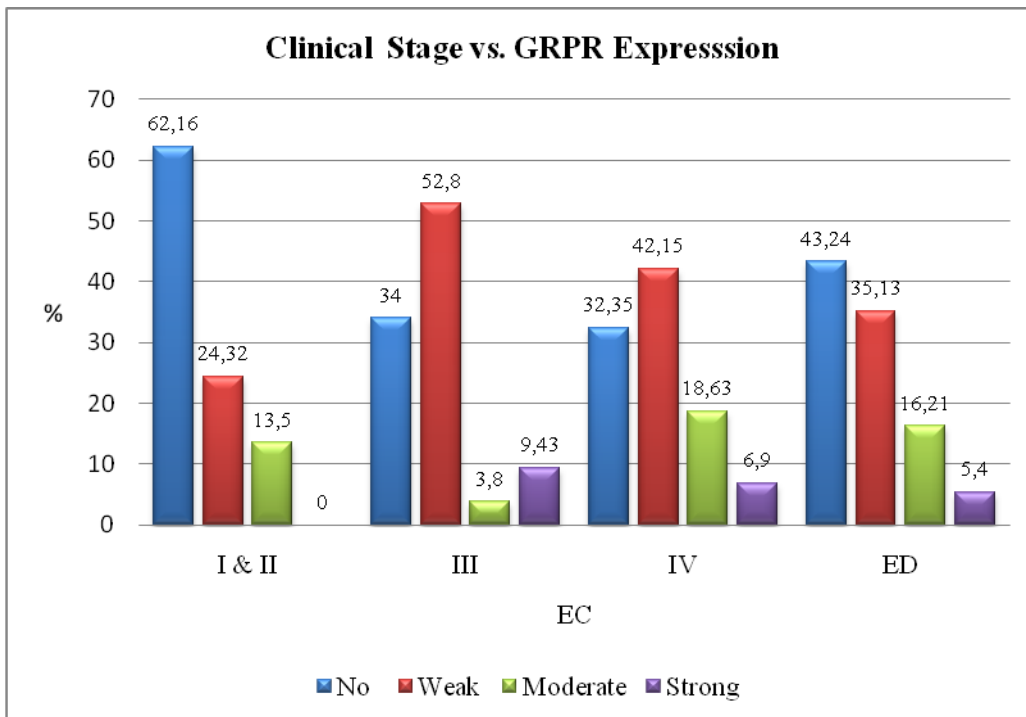
**Figure 1: GRPR expression in samples studied (A) No Expression (B) Weak Expression (C) Moderate Expression (D) Strong Expression (Original Magnification x 400)**

Histology	Negative	% Stained Cells								
		1%-25%			25-50%			50-100 %		
		1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+
Adenocarcinoma (n=100)	32	17	0	0	12	2	0	13	14	10
Squamous (n=71)	31	7	0	0	7	1	0	15	7	3
Large Cells (n=29)	12	6	0	0	3	1	0	3	2	2
Small Cell (n=38)	18	5	0	0	3	0	0	5	5	1

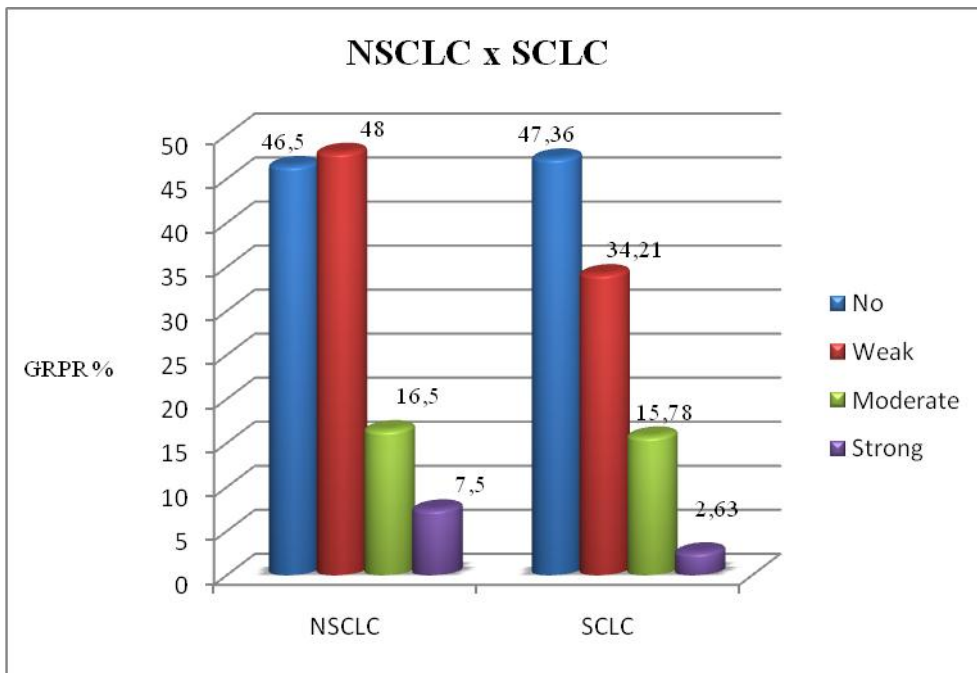
**Figure 2: Results of immunohistochemical according frequency of intensities**



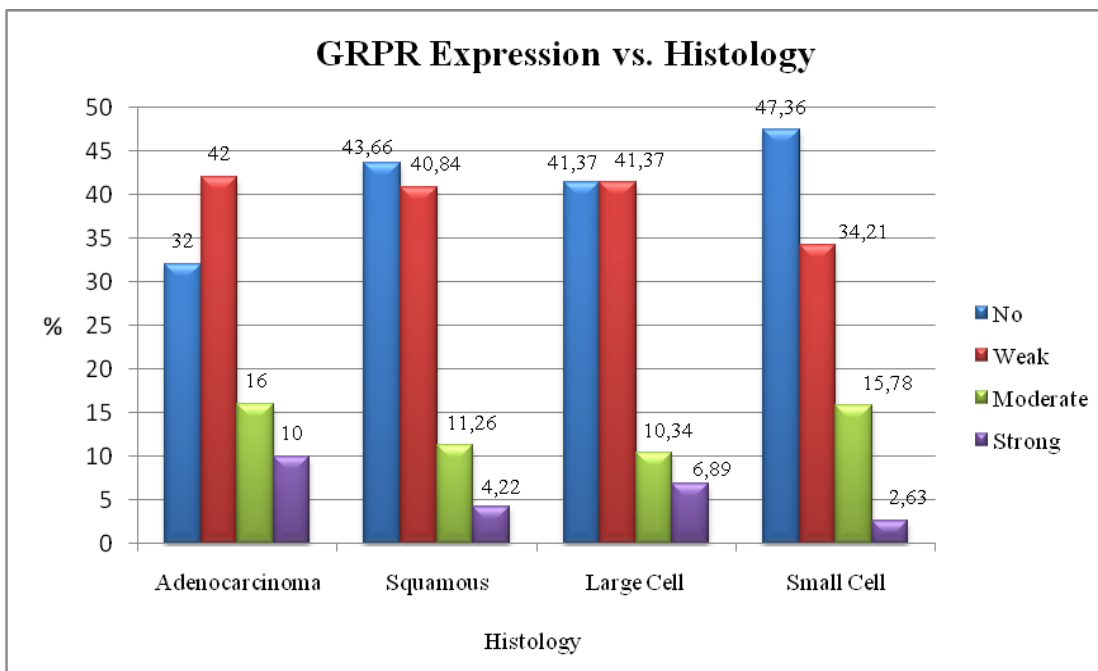
**Figure 3: Distribution of GRPR expression in lung cancer and in non- neoplastic lung tissue**



**Figure 4: Distribution of GRPR expression in clinical stages of patients studied**



**Figure 5: GRPR expression in NSCLC and SCLC**



**Figure 6: Distribution of GRPR expression in different histological types of lung cancer**

## Bibliography:

1. Cornelio, DB, Roesler, R. and Schwartzmann, G .Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy} Eur Soc Med Oncology, 2007, Annals of oncology, Vol. 18, p. 1457.
- 2 . Jemal A, Siegel R. Cancer statistics, 2008. Am Cancer Soc, 2008, CA: a cancer journal for clinicians, Vol. 58, p. 71.
3. Pass, H.I. Principles and practice of lung cancer. Fourth edition, 2010.
4. Winer E, Gralow J, Diller L. Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening a report from the American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology, 2009, Journal of Clinical Oncology, Vol. 27, p. 812.
5. Disease, Centers for and Prevention. <http://www.cdc.gov/>. <http://www.cdc.gov/>. 2010.
6. Weber H, C. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009 Vol. 16, pp. 66-71.
7. Li X. Gastrin-releasing peptide links stressor to cancer progression. J Cancer Res Clin Oncol, 4, 2010, Vol. 136, pp. 483-491.
8. Cornelio D, Meurer L, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. Oncology, 2008, Vol. 73, pp. 340-345.
9. Flores DG, Meurer L, Uberti AF, Macedo B R. Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. Brain Res Bull, 2010 Vol. 82, pp. 95-98.
10. Gosney JR, Sissons MC, Allibone RO. Neuroendocrine cell populations in normal human lungs: a quantitative study.: BMJ Publishing Group Ltd and British Thoracic Society, 1988, Thorax, Vol. 43, p. 878.
11. Patel A, Shulkes, Baldwin B. Gastrin-releasing peptide and cancer. Biochim Biophys Acta, 2006 Vol. 1766, pp. 23-41.
12. Moody TW, Bertness V, Carney DN. Bombesin-like peptides and receptors in human tumor cell lines Peptides, 1983 Vol. 4, pp. 683-686.
13. Schwartzmann G, Di Leoni L. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies} Investigational new drugs 2006, Vol. 24, pp. 403-412.
14. Cuttitta, F, Carney, D, Mulshine, J, Moody T. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. Nature Publishing Group, 1985
15. Baylin, S. & Mendelsohn, G. Ectopic (inappropriate) hormone production by tumors: mechanisms involved and the biological and clinical implications. Endocrine Reviews, Endocrine Soc, 1980, 1, 45
16. Abe K, Adachi I, Miyakawa, S, Tanaka, M. Production of calcitonin, adrenocorticotrophic hormone, and  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone in tumors derived from amine precursor uptake and decarboxylation cells}: AACR, 1977, Cancer Research, Vol. 37, p. 4190.
17. Thomas S. M, Bholra NE, Zhang Q. Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res, 24, 2006, Vol. 66, pp. 11831-11839.



18. Zhang Q, Thomas S M, Xi S. Smithgall, T. E Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. 2007, *Mol Cancer Ther*, 2007 Vol. 6, pp. 1414-1424.
19. Liu X, Carlisle D. L, Swick, M. C .Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res*, 2007, Vol. 313, pp. 1361-1372.
20. Thomas SM, Grandis JR, Wentzel A L. Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia*, 2005 Vol. 7, pp. 426-431.
21. Van de Wiele C, Phonteyne P, Pauwels P, Goethals I. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *Soc Nuclear, Journal of Nuclear Medicine*, 2008 Vol. 49, p. 260.
22. Constantinides C, Lazaris A C. Immunohistochemical detection of gastrin releasing peptide in patients with prostate cancer. *World J Urol*, 2003. Vol. 21, pp. 183-187.
23. Sunday M, Hua J, Dai H, Nusrat A. Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 1990 Vol. 3, p. 199.
24. Shan L, Emanuel R, Dewald D, Torday J. Bombesin-like peptide receptor gene expression, regulation, and function in fetal murine lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004 Vol. 286, p. 165.
25. Yamaguchi K, Abe K, Kameya T, Adachi I. Production and Molecular Size Heterogeneity of Immunoreactive Gastrinreleasing Peptide in Fetal and Adult Lungs and Primary Lung Tumors. *Cancer research*, 1983 Vol. 43, p. 3932.
26. Frankel A, Tsao M, Viallet J. Receptor subtype expression and responsiveness to bombesin in cultured human bronchial epithelial cells., *Cancer research*, 1994 Vol. 54, p. 1613.
27. Yamaguchi K, Aoyagi K, Urakami K. Enzyme-linked Immunosorbent Assay of Pro-gastrin-releasing Peptide for Small Cell Lung Cancer Patients in Comparison with Neuron-specific Enolase Measurement. *Cancer Science*, 1995 Vol. 86, pp. 698-705.
28. Sunday ME. Pulmonary Neuroendocrine Cells and Lung Development. *Endocr Pathol*, 3, 1996 Vol. 7, pp. 173-201.
29. Patel JD, Bach PB. Lung cancer in US women: a contemporary epidemic. *Jama*, 2004 Vol. 291, p. 1763.
30. Shriver SP, Bourdeau HA, Gubish CT. Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2000 Vol. 92, pp. 24-33.
31. Risch H, Howe G, Jain M. Are female smokers at higher risk for lung cancer than male smokers? *American journal of epidemiology*, 1993 Vol. 138, p. 281.