

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

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CANAL ANAL**

FABÍOLA FERNANDES MARTINS

ORIENTADOR: PROFESSOR DANIEL DE CARVALHO DAMIN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2013

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

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CANAL ANAL**

FABÍOLA FERNANDES MARTINS

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Carvalho Damin

Porto Alegre
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Fernandes Martins, Fabíola
EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE
GASTRINA NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CANAL ANAL /
Fabíola Fernandes Martins. -- 2013.
75 f.

Orientador: Daniel de Carvalho Damin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Receptor do peptídeo liberador de gastrina. 2.
Carcinoma epidermóide de canal anal. 3. Peptídeo
liberador de Gastrina. I. de Carvalho Damin, Daniel,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

À minha família pelo incentivo e amor. Por terem contribuído e me ajudado a ser o que sou.

Ao meu esposo, Fernando, pelo amor, dedicação e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À equipe de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante a minha formação. Dr. Paulo Contu, Dr. Cláudio Tarta, Prof. Dr. Mario Antonello Rosito e Prof. Dr. Daniel de Carvalho Damin, pela dedicação durante os anos de residência e pelo exemplo a ser seguido como profissional. Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Daniel Damin, pelo aprendizado, incentivo, oportunidade e paciência.

À Dra. Luise Meurer e ao Dr. Gilberto Schwartzmann pela colaboração técnica científica e enriquecimento deste projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental, em especial à Flávia Grossmann, pela ajuda e presteza constantes.

Ao estatístico Luciano Guimarães pela orientação na análise estatística dos dados.

Ao FIPE/HCPA pelo financiamento desta pesquisa.

Conceda-me, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar as que eu posso e sabedoria para distinguir uma das outras
Reinhold Niebuhr

De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.
Fernando Sabino

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	13
CÂNCER DE CANAL ANAL	13
PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA – GRP	19
GRPR E CÂNCER	23
JUSTIFICATIVA.....	29
OBJETIVOS.....	30
OBJETIVO PRINCIPAL	30
OBJETIVO SECUNDÁRIO	30
MATERIAIS E MÉTODOS	31
DELINEAMENTO DO ESTUDO	31
POPULAÇÃO ESTUDADA.....	31
IMUNOISTOQUÍMICA.....	31
ANÁLISE DOS PADRÕES DE COLORAÇÃO.....	32
ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	34
ANEXO.....	44
ARTIGO ORIGINAL.....	45
ARTIGO EM PORTUGUES	59
REFERÊNCIAS DO ARTIGO ORIGINAL.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

BB3R	Receptor órfão da bombesina 3
BLP	Peptídeo semelhante a bombesina
CCK	Colecistoquinina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de crescimento epidérmico
GRP	Peptídeo Liberador de Gastrina
GRPR	Receptor preferencial do peptídeo liberador de gastrina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papiloma vírus humano
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NMB	Neuromedina B
NMBR	Receptor de neuromedina B
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Mensageiro do ácido ribonucléico
TNM	Tumor, linfonodos e metástases

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de Estadiamento -TNM Câncer Anal	16
Tabela 2. Grupos de estadiamento - Estadiamento Câncer Anal	16
Tabela 3. Expressão de GRP em tecidos neoplásicos humanos	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do canal anal	15
Figura 2. Sequências de aminoácidos contidos na Bombesina, GRP e NMB	20
Figura 3. Estrutura da bombesina	22
Figura 4. Vias de Sinalização intracelular ativadas pela Bombesina/GRP receptor	22

INTRODUÇÃO

O câncer de canal anal é uma neoplasia rara, representando menos de 2% dos tumores malignos do trato gastrointestinal. O carcinoma epidermóide é o tipo histológico mais comum de câncer anal, correspondendo a 85 % dos casos. Atualmente, a incidência da doença vem aumentando, muitas vezes com um comportamento mais agressivo e de difícil resposta ao tratamento. Dados globais apontam para um aumento na taxa de incidência do carcinoma invasivo de canal anal.¹

Na década de setenta, Nigro e colaboradores² introduziram o conceito de quimio e radioterapia combinadas para o tratamento do câncer de canal anal. Desde então, a terapia de escolha do carcinoma de canal anal tornou-se não cirúrgica, reservando a ressecção abdominoperineal e colostomia definitiva somente aos casos refratários ao tratamento inicial. Apesar do sucesso da quimioterapia associada à radioterapia, 10 a 15% dos pacientes não respondem a este tratamento, alguns tendo efeitos colaterais que impedem sua conclusão e 10 a 30% apresentando recorrência da doença.³ A heterogeneidade de resposta ao tratamento combinado sugere que fatores preditores de resposta oncológica e novas abordagens terapêuticas devam ser avaliadas.

Embora muitos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer anal já tenham sido identificados, tais como a prática de sexo anal receptivo e a imunodeficiência, os mecanismos moleculares relacionados com a carcinogênese anal permanecem obscuros. O papilomavírus humano (HPV) foi identificado como

agente causador do carcinoma epidermóide de canal anal, uma vez que está relacionado à lesão precursora do carcinoma invasivo, a neoplasia intraepitelial anal. Esse mecanismo de desenvolvimento do câncer anal é análogo ao que se observa no desenvolvimento do carcinoma de colo uterino.⁴⁻⁶ Sugere-se, desta forma, que biomarcadores potencialmente envolvidos na carcinogênese cervical também possam ser importantes no desenvolvimento do carcinoma anal.

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) é um agente neuroendócrino amplamente estabelecido como um fator de crescimento tumoral em diversos tipos de câncer.⁷ Fortes evidências na literatura têm demonstrado que o GRP atua como fator mitogênico e proangiogênico e, assim como seu receptor (GRPR), tem implicações na progressão e disseminação tumoral.⁸

O conhecimento da expressão e distribuição do GRPR pode gerar aplicações clínicas para o diagnóstico e terapêutica em diferentes tipos de câncer, bem como auxiliar na detecção precoce de tumores. Até o presente momento, não há estudos na literatura avaliando a expressão do receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) em tumores de canal anal. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de GRPR em biópsias de carcinoma epidermóide de canal anal e compará-las com a expressão em tecidos anais não neoplásicos.

REVISÃO DA LITERATURA

Câncer de canal anal

O câncer de canal anal é uma neoplasia relativamente rara, cuja incidência vem aumentando ao longo dos anos. O carcinoma epidermóide é o tipo histológico mais frequentemente encontrado, representando de 80 a 85% dos tumores anais e cerca de 2,4% dos cânceres colorretais. A incidência da doença tem grande variação geográfica, sendo registrado um índice anual de 0,5 até 4 casos por 100.000 habitantes a cada ano.^{1,9} Estimativas apontam para 6230 novos casos e 780 mortes nos Estados Unidos em 2012.¹ No Brasil não se dispõe de dados específicos quanto à incidência do câncer anal, porém estima-se que, em 2010, morreram 274 pacientes (176 mulheres e 98 homens) em decorrência da neoplasia.¹⁰

A média de idade ao diagnóstico é de 60 anos, estando mais da metade dos pacientes entre 45 e 65 anos de idade. Historicamente, o câncer anal é uma doença que acomete mais mulheres do que homens, tendo uma proporção de 5 mulheres para cada homem diagnosticado. Nos últimos anos, no entanto, a incidência em pacientes mais jovens vem aumentando em decorrência das doenças sexualmente transmissíveis como as infecções pelo HPV e HIV. Tabagismo, intercurso anal receptivo, multiplicidade de parceiros e imunossupressão crônica (por exemplo em pacientes transplantados) também são considerados fatores de risco.^{3,4}

A lesão intraepitelial de alto grau, precursora do carcinoma epidermóide, tem sido relacionada à infecção pelo HPV, de forma semelhante ao que ocorre nas lesões intraepiteliais do colo uterino. Cerca de um terço dos mais de 100 tipos de HPV podem infectar o epitélio da região anogenital.¹¹ A infecção pelos tipos oncogênicos, como os HPVs 16 e 18, causa a neoplasia intraepitelial anal que pode progredir de displasia de baixo grau à displasia de alto grau e, por fim, ao carcinoma invasor. Uma vez estabelecida a displasia de alto grau, raramente ocorre regressão de tais lesões.¹²

De acordo com estudo recente, o HPV é detectado em 71% dos carcinomas anais. A infecção pelos subtipos 16 e 18 está presente em cerca de 72% destes casos, de forma análoga ao que ocorre no colo uterino.^{3,13,14} No canal anal a chamada zona de transição é particularmente suscetível à infecção viral.¹³ Esta região situa-se ao nível da linha denteada (Figura 1), sendo revestida por diferentes epitélios: escamoso, colunar e transicional (semelhante ao epitélio encontrado nas vias urinárias). Em 2011 foi proposta pela Sociedade Americana de Cirurgia Colorretal a nomenclatura de Zona de Transformação para denominar esta região.³

O termo carcinoma epidermóide é empregado para os diversos subtipos histológicos de tumores escamosos do canal anal (basalóide, cloacogênico e células transicionais), já que, independente de serem queratinizados ou estarem localizados abaixo ou acima da linha pectínea, apresentam a mesma origem embrionária e tendem a apresentar comportamento biológico e resposta semelhantes ao tratamento.^{3,15,16}

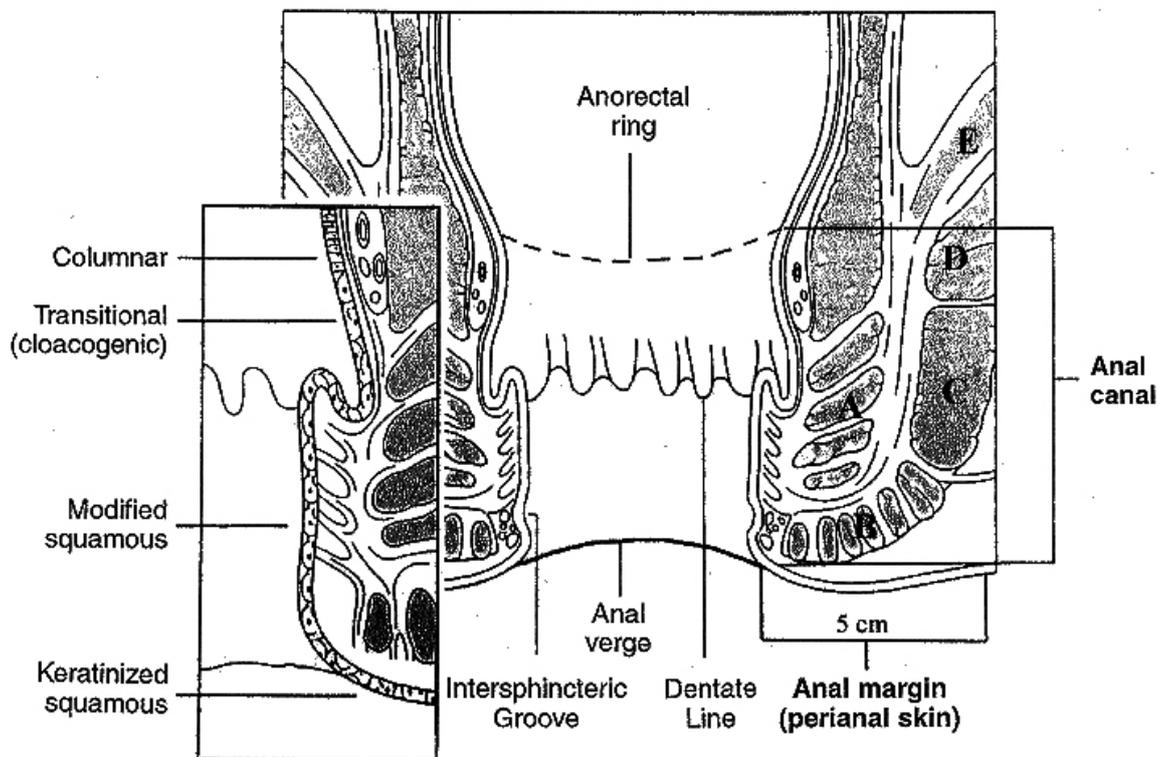


Figura 1: Anatomia do canal anal

Fonte: Fuchshuber PR, Rodriguez-Bigas M, Weber T, Petrelli NJ. Anal canal and perianal epidermoid cancers. J Am Coll Surg. 1997 Nov;185(5):494-505

O sistema de estadiamento dos tumores de canal anal mais amplamente utilizado é a classificação de TNM da “American Joint Committee on Cancer” – 7ª edição, 2010. Curiosamente, a classificação é baseada em dados históricos de estudos realizados quando o padrão ouro de tratamento ainda era a ressecção cirúrgica.¹¹ Este sistema leva em consideração o tamanho do tumor, número de linfonodos comprometidos e metástases envolvendo órgãos distantes (Tabelas 1 e 2). O fator prognóstico mais importante é o tamanho do tumor. Entretanto, as variáveis idade, diferenciação tumoral, metástases linfonodais, raça, gênero e *status* socioeconômico também têm sido apontados como fatores prognósticos relevantes. A sobrevida estimada em cinco anos de acordo com o estadiamento tumoral é a seguinte: Estádio I = 70%, Estádio II = 59% Estádio III = 40% e Estádio IV = 19%.³

Tabela 1: TNM Câncer Anal

T - Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho que invade órgão(s) adjacente(s), p. ex., vagina, uretra, bexiga

N- Linfonodos Regionais

NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) peri-retal(ais)
N2	Metástase em linfonodo(s) ilíaco(s) interno(s) e/ou inguinal(ais) unilateral(ais)
N3	Metástase em linfonodos peri-retais e inguinais e/ou linfonodos ilíacos internos bilaterais e/ou inguinais bilaterais

M - Metástase à Distância

MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA). Referência original AJJC modificada. Tipos de câncer no Brasil. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/exibe.asp?ID=2>

Tabela 2: Estadiamento Câncer Anal

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Estádio IIIB	T4	N1	M0
	Qualquer T	N2, N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA). Referência original AJJC modificada. Tipos de câncer no Brasil. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/exibe.asp?ID=2>

Atualmente, a combinação de quimioterapia sistêmica à radioterapia local é considerada o tratamento padrão para o carcinoma epidermóide de canal anal. Tal terapia foi descrita pela primeira vez por Nigro e colaboradores,² em um estudo cujos pacientes foram tratados com radioterapia associada ao uso de 5-fluoracil e mitomicina-C, apresentando resposta clínica completa em 86% dos casos. O tratamento cirúrgico é hoje reservado para tumores superficiais e bem diferenciados. A amputação abdominoperineal de reto é utilizada como cirurgia de resgate em caso de falha do tratamento combinado ou em recidivas tumorais após uma resposta inicial. No entanto, apesar de estudos subsequentes terem confirmado a superioridade da terapia combinada, evidenciou-se uma heterogeneidade de resposta aos quimioterápicos e à dose de radiação aplicada, sugerindo um espectro amplo de sensibilidade dos tumores ao tratamento.^{17,18}

Recente revisão da literatura analisou os estudos que avaliaram potenciais biomarcadores no câncer de canal anal como fatores preditivos de resposta favorável à terapia quimiorradioterápica.¹⁹ Foram catalogados 68 artigos e, na análise final, uma vez aplicados critérios de inclusão/exclusão de estudos, foram revisados 21 estudos. Um total de 29 biomarcadores foram documentados nas pesquisas, pertencentes a 9 classes funcionais diferentes, tais como marcadores de supressão tumoral, proliferação e invasão, reguladores de apoptose, marcadores tumorais e receptores de fator de crescimento. Somente 13 biomarcadores apresentaram associação com a evolução clínica em pelo menos um estudo. Os genes de supressão tumoral, p53 e p 21, foram os únicos marcadores que demonstraram ter valor prognóstico em mais de um estudo. A presença do EGFR (receptor do fator de

crescimento epidérmico) em amostras tumorais de câncer de canal anal foi abordada em cinco estudos diferentes e, apesar das taxas de expressão variarem entre 55 a 100%, não teve correlação com prognóstico ou resposta à terapia.¹⁹ Tais estudos sugerem que, apesar do conjunto de biomarcadores documentados, nenhum pode ser considerado fator preditivo de resposta à terapia combinada neste momento. Neste contexto, fica clara a necessidade de estudos clínico-laboratoriais para a identificação de novos biomarcadores no câncer de canal anal.

Peptídeo Liberador de Gastrina – GRP

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) foi identificado como fator de crescimento no câncer. Tais fatores desempenham papel importante na proliferação e progressão de células neoplásicas, estando envolvidos na invasão local, angiogênese, metástases à distância e apoptose.^{7,8}

O GRP é um peptídeo de 27 aminoácidos que foi identificado originalmente no estômago de porcos. Apresenta uma sequência de 7 aminoácidos terminais COOH semelhantes à bombesina (Figura 2), o que determina efeitos fisiológicos similares entre os dois peptídeos.^{20,21} A bombesina (Figura 3) é um tetradecapeptídeo que foi isolada a partir da pele de sapo do gênero *Bombina bombina*.²³ Diversos peptídeos semelhantes à bombesina (BLPs) foram identificados nos mamíferos, como o GRP e a neuromedina B (NMB).²³ O principal BLP foi denominado peptídeo liberador da gastrina, em virtude da ação de estimular a secreção de gastrina a partir das células G do antro gástrico.²⁴

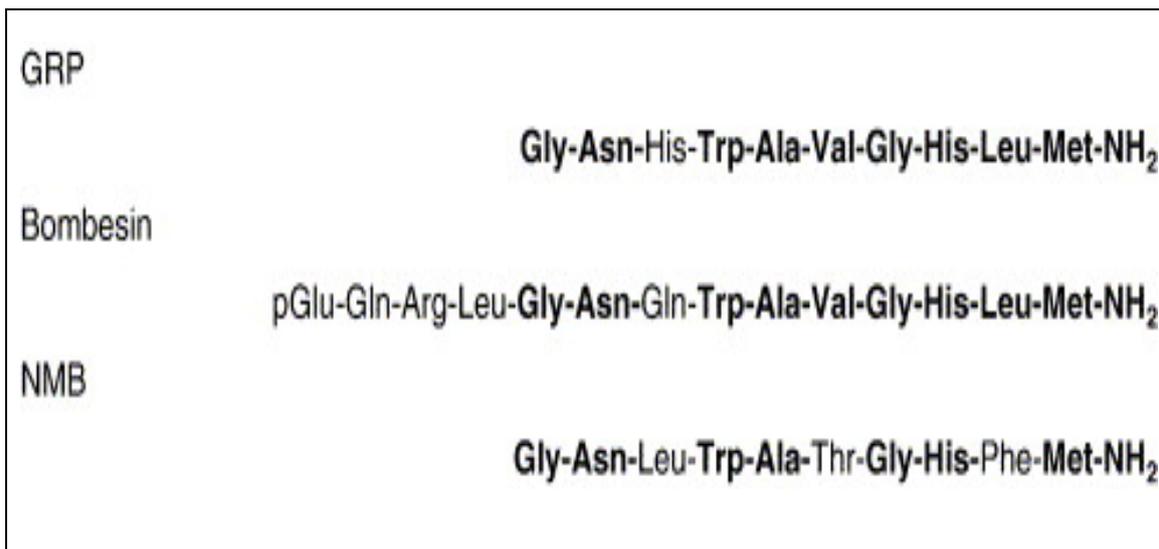


Figura 2: Sequências de aminoácidos contidos na Bombesina, GRP e NMB.

Aminoácidos marcados em negrito são idênticos

Fonte: Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. *Gastrin-releasing peptide and cancer*. *Biochim Biophys Acta*. v. 1766; p.23-41, 2006

Peptídeos gastrointestinais como BLPs, gastrina, colecistoquinina (CCK) e a neurotensina são um grupo estruturalmente diverso de mensageiros moleculares que atuam em uma rica rede de troca intracelular de informações em todo organismo. São produzidos por células neurais ou endócrinas que atingem seus propósitos como neurotransmissores reguladores parácrinos ou hormônios sistêmicos.²⁵

Identificaram-se três subtipos de receptores para a família dos BLPs em mamíferos: o receptor preferencial do GRP – GRPR, o receptor de neuromedina B – NMBR, e o receptor órfão da bombesina 3 – BB3R. Esses receptores podem ser distinguidos por meio de sua afinidade pelos agonistas e antagonistas do GRP.^{20,26}

Os receptores de GRP pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína G, uma molécula de superfície celular que contribuiu com mais de 2 % dos genes codificados pelo genoma humano.²⁷ O receptor preferencial do GRP, o GRPR,

que é expresso em uma variedade de células tumorais, tem distribuição limitada em tecido normal e tem alta afinidade por bombesina e GRP.^{28, 29} A ligação de um agonista ao GRPR leva à ativação da fosfolipase C e aumento das concentrações de inositol trifosfato, diacilglicerol e cálcio (Figura 4).³⁰ Ele ativa múltiplos sinais na cascata de sinalização celular, resultando em migração, proliferação e crescimento.^{25,31}

O GRPR é encontrado no trato gastrointestinal, do esôfago ao reto, influenciando a secreção de peptídeos hormonais entéricos e secreção exócrina pancreática e gástrica. Apresenta implicações no ritmo circadiano e termo-regulatório, no peristaltismo intestinal e na sensação de saciedade. Diversas linhas de estudo têm evidenciado que o GRP e o seu receptor preferencial desempenham um papel nas vias da memória, desordens psiquiátricas e neurológicas.^{20,32,33,34} Estudos pré-clínicos evidenciam que o GRP possui importante função imuno moduladora e inflamatória, regulando a atração química de macrófagos e linfócitos, além de estímulo celular, mediando a citotoxicidade e ativação das células *natural killer*.^{35,36,37}

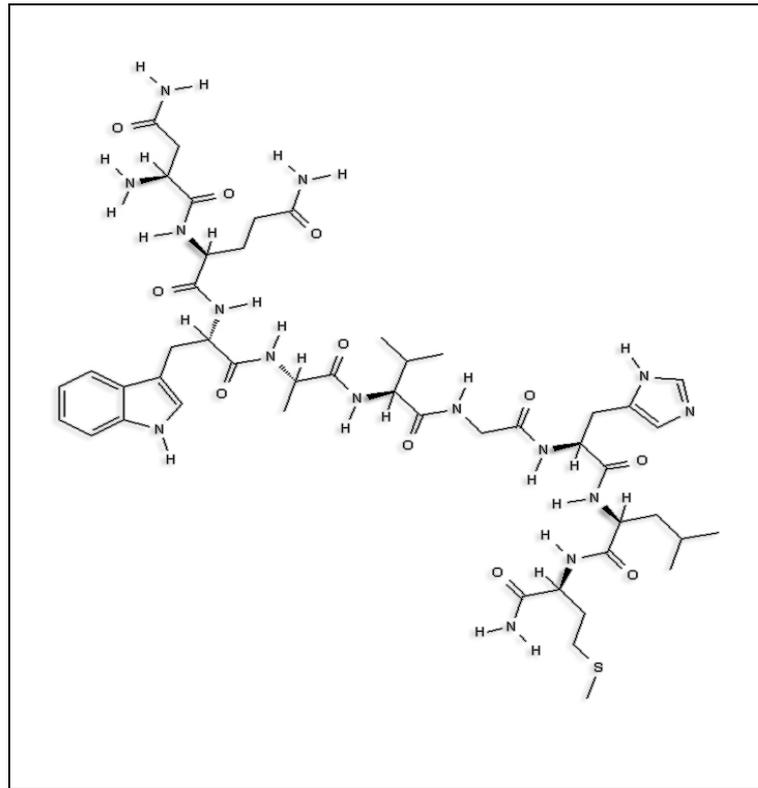


Figura 3: Estrutura bombesina.

Fonte: Online Database of Chemicals. Disponível em <http://www.chemblink.com>

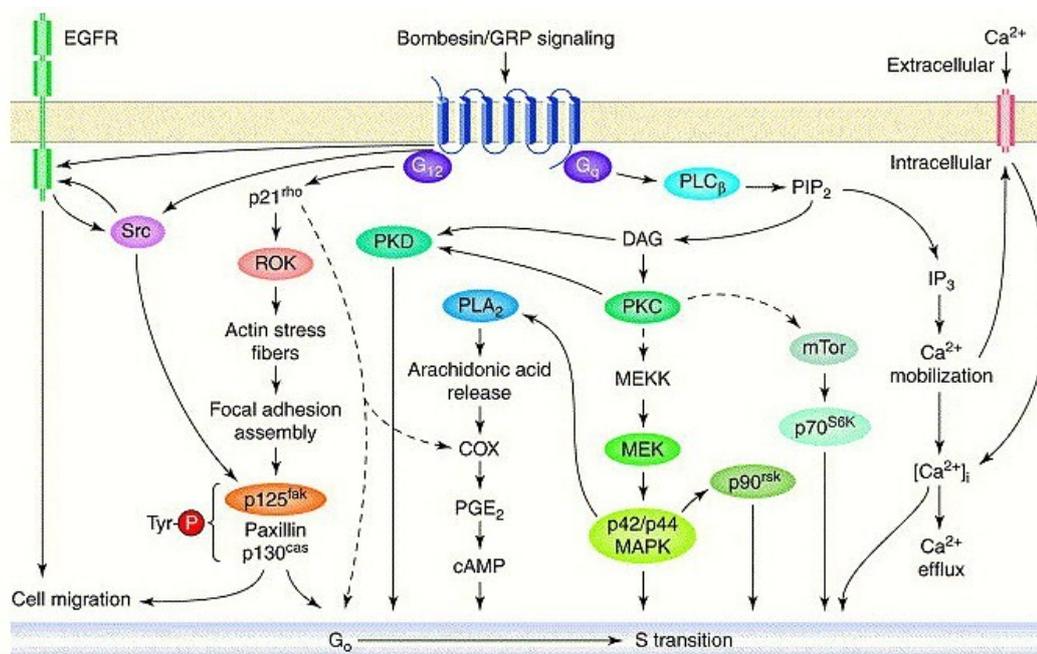


Figura 4: Vias de sinalização intracelulares ativadas pela bombesina/GRP receptor

Fonte: Rozenfurt E, Guha S, Sinnott-Smith J. Gastrointestinal peptide signalling in health and disease Eur J Surg Suppl.; 587:23-38, 2002.

GRPR e Câncer

O GRP e seu receptor têm sido amplamente estudados como fator de crescimento tumoral em diversos tipos de câncer. Um número cada vez maior de evidências tem demonstrado seu comportamento mitogênico, morfogênico e proangiogênico com implicações na progressão e disseminação tumoral.^{7,8} Receptores GRPR são anormalmente expressados em carcinomas humanos em comparação com o tecido normal.³⁸ O primeiro estudo em neoplasias de pulmão demonstrou que o bloqueio do GRP com anticorpos dirigidos ao seu receptor, inibe o crescimento do câncer *in vitro* e *in vivo*.³⁹

O mecanismo pelo qual o peptídeo exerce seu papel oncogênico, no entanto, não está totalmente esclarecido. Sabe-se que, após a ligação ao seu receptor, múltiplas vias de sinalização celular são deflagradas, tais como proteína quinase C, fosforilação de tirosina quinase de adesão focal e mobilização de cálcio, levando ao crescimento e proliferação celular.^{7,40}

A exteriorização de receptores de fatores de crescimento na superfície da célula maligna confere maior agressividade biológica às neoplasias, promovendo proliferação celular, invasão local, metastatização, angiogenese e diminuição da apoptose. Estes parâmetros vêm sendo investigados nos estudos com GRPRs.

A expressão de GRPR foi investigada em vários tipos de neoplasias humanas. Diversas linhas de pesquisa têm avaliado a participação do GRP/GRPR em diferentes tumores humanos, tais como mama,^{41,42} ovário,⁴³ rim,^{38,44} esôfago,⁴⁵ estômago,⁴⁶ pâncreas,^{47,48} tumor carcinóide⁴⁹ (tabela 3). Em alguns, a taxa de expressão dos receptores chega a 100% das células tumorais.⁵⁰⁻⁵⁶

Tabela 3: Expressão de GRP em tecidos neoplásicos humanos.

Tipo de tumor	Número de casos avaliados	Número de casos positivos	%
Próstata	12	12	100
	30	30	100
	80	50	63
Gastrinoma	5	5	100
Mama	100	33	33
	71	44	62
	57	41	72
Ovário	22	17	77
Pâncreas	12	2	17
	26	2	8
	29	0	0
Cólon	21	5	24
	29	27	93
	50	38	76
Renal	4	4	100
	16	6	35
	18	13	72
Pulmão	7	2	29
	9	3	33
Cabeça e pescoco	25	25	100
	9	3	33
Neuroblastoma	33	24	73
Uterino	29	11	38

Fonte : Adaptado de Sun B, Halmos G, Schally AV, et al. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancer. *Prostate*, v.42(4), p.295-303, 2000.

A correlação do aumento da expressão do GRPR durante a transformação neoplásica foi investigada no carcinoma epidermóide de esôfago e em epitélio brônquico, como fator de risco para desenvolvimento de câncer em não fumantes.⁵⁸ Fang e colaboradores⁴⁵ demonstraram, por meio da técnica de hibridização *in situ*, expressão de GRPR em 70% dos carcinomas de esôfago, 71% das displasias, 43% das hiperplasias e em somente 18% do epitélio normal. Desta forma, foi caracterizado o aumento progressivo de expressão a partir do tecido normal até a neoplasia invasora.

A correspondência entre prognóstico e expressão do complexo GRP/GRPR foi analisada na neoplasia de próstata e tumores colorretais. Constantinides e colegas⁵² correlacionaram a presença do GRP no carcinoma de próstata com a resposta clínica dos pacientes, encontrando uma associação positiva entre a expressão imunohistoquímica com os estágios avançados e a recorrência tumoral. Pacientes com uma alta expressão de GRP estão sob risco aumentado de recidiva e progressão da doença. Em estudo subsequente, foi demonstrada a superexpressão do GRPR em carcinomas de próstata invasivos e na primeira fase de transformação neoplásica do tecido prostático.⁵³ Contraditoriamente, Rivera⁵⁹ e Carrol⁶⁰ não estabeleceram correlação entre o aumento da expressão do peptídeo e seu receptor com sobrevida, tempo de recorrência da doença e diferenciação tumoral nos tumores colorretais. Sugerindo inclusive, que a presença deles não esteja relacionada como fator do crescimento tumoral. Entretanto alguns autores demonstraram que amostras de câncer colorretal apresentam expressão mais intensa de GRPR que a mucosa normal adjacente^{54,60} e verificaram taxas de expressão significativamente maiores em tumores indiferenciados e com invasão angiolinfática.^{55,56}

Os tumores femininos também têm sido amplamente abordados. Na neoplasia de mama, através da técnica de radiografia com radioligante, foi encontrada elevada percentagem de tecido mamário neoplásico com expressão de GRPR positiva. As metástases linfonodais axilares dos tumores que apresentavam receptores de GRP foram 100% positivas enquanto o tecido linforeticular adjacente foi negativo.⁴¹ Sun e colaboradores estudaram a expressão dos subtipos de receptores GRP/Bombesina em espécimes de neoplasia de ovário, identificando menor presença de GRPR em tumores pobremente diferenciados e maior número de receptores da bombesina subtipo 3 em tumores em estágio IV.⁴³

Cornelio e colegas⁶¹ conduziram importante estudo no carcinoma de colo uterino. Por meio de imunocitoquímica, foi demonstrada diferença de distribuição da presença do GRPR nas lesões invasivas e pré-invasivas do câncer cervical. O GRPR foi detectado em 99% dos espécimes tumorais, a maioria exibindo coloração moderada a forte. O receptor raramente foi detectado na endocérvice, enquanto na ectocérvice foi expresso somente nas áreas adjacentes às lesões neoplásicas.

Em outro estudo mais recente, o mesmo grupo avaliou o potencial diagnóstico da imunocitoquímica do GRPR na detecção das displasias cervicais e câncer invasor. Inicialmente, esfregaços cervicais foram coletados de 66 mulheres para avaliação citopatológica, exame de Papanicolau, e análise de expressão do GRPR pela técnica de imunocitoquímica. Imunocitoquímica para o GRPR complementar foi realizada em tecidos quando anormalidades eram detectadas nos exames iniciais. A imunocoloração do GRPR apresentou sensibilidade de 87,5% na detecção de lesões cervicais e especificidade de 76,7%. Também foi evidenciada acurácia de 80% na identificação de ASCUS (células escamosas atípicas de significado incerto), com

88% de sensibilidade e 71% de especificidade. A efetividade da imunocoloração em detectar lesões cervicais foi 10% maior que o exame Papanicolau, com um ganho de 11,1% na especificidade.⁶² Segundo os autores, tais resultados fornecem uma base molecular sólida para a exploração de GRPR como um alvo diagnóstico e terapêutico nas neoplasias cervicais.

Neste contexto, a identificação dos receptores GRPR por estudo de imagem pode ser uma ferramenta potencialmente útil como método de detecção de tumores e metástases.⁶³⁻⁶⁵ Do ponto de vista terapêutico, os agonistas podem ser carreadores de drogas citotóxicas^{66,67} e, ligados a emissores beta, coadjuvantes no tratamento radioterápico,^{68,69} enquanto os antagonistas poderiam inibir o crescimento tumoral por meio do bloqueio dos receptores.

O antagonista do GRPR tem sido desenvolvido como um composto anticâncer, exibindo expressiva atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em tumores murinos e humanos.^{37,42,70,71} A inibição de GRPR demonstrou -se interferir com outras sinalizações de fatores de crescimento relevantes como EGF e VEGF,^{37,48,72} atenuação da expressão de oncogenes,⁷³ e proteína quinases.⁷⁴ RC-3095 e RC-3940-II são exemplos de antagonistas do GRP testados em estudos, tais como linhagens celulares de mama,⁷⁵ próstata⁷⁶ e colón.⁷⁷

O RC-3095 é um antagonista sintético que tem demonstrado um importante efeito na patogênese do processo inflamatório em modelos animais de sepse, artrite e modelo experimental de doença inflamatória intestinal.⁷⁸⁻⁸⁰

Em nossa instituição, foi conduzido um estudo de fase I com RC-3095 para determinar a segurança e a viabilidade da administração subcutânea em 25

pacientes com vários tipos de neoplasias sólidas avançadas e refratárias à quimioterapia. O antagonista mostrou ter perfil de toxicidade favorável. As doses foram administradas uma vez ou duas vezes por dia, variando de 8 a 96 ug/kg. O único efeito de toxicidade observado foi apenas desconforto local na região de injeção em doses mais altas. Não foi verificada resposta tumoral, entretanto a dose máxima da medicação não foi atingida.⁸¹

JUSTIFICATIVA

O carcinoma epidermóide de canal anal apresenta taxas relativamente altas de recorrência e não resposta ao tratamento inicial. O estudo de novos biomarcadores como opção terapêutica em câncer pode gerar novas perspectivas no tratamento dessas doenças. O GRPR tem se mostrado um alvo promissor tanto na terapia quanto no diagnóstico do câncer. Não existem dados conhecidos quanto à expressão de GRPR no carcinoma epidermóide anal. No entanto, achados significativos quanto à expressão de GRPR em câncer de colo uterino, cuja etiologia é análoga à do canal anal, sugerem que este peptídeo possa ser importante no desenvolvimento da neoplasia anal.

A revisão na literatura da expressão do GRPR em tumores humanos mostrou que a análise do receptor pode ser realizada através de diferentes técnicas. Optamos pela realização da imunohistoquímica por tratar-se de um método simples e acessível e que faz parte da rotina da maioria dos serviços de patologia.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Investigar a expressão de GRPR em tecidos tumorais de carcinoma epidermóide de canal anal.

Objetivo Secundário

Verificar se existe diferença significativa na expressão entre tecidos malignos e não malignos no canal anal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Estudo transversal controlado.

População estudada

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de canal anal provenientes do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2002 a 2012. Como controles, foram avaliados espécimes cirúrgicos de hemorroidectomias realizadas em pacientes do mesmo serviço. Não foram incluídas no estudo amostras de pacientes HIV positivo. Do grupo controle foram excluídos espécimes de hemorróidas em que não se identificava a zona de transição do canal anal. O estudo foi aprovado pelo Comitê Ética em Pesquisa do HCPA.

Imunoistoquímica

A amostra mais representativa de cada caso foi selecionada por um patologista e submetida à técnica de coloração imunoistoquímica. A análise da expressão do GRPR foi feita utilizando-se um anticorpo anti-GRPR policlonal de coelho (nº de catálogo ab39883, Abcam - Cambridge, MA USA) na diluição 1:400. Nos blocos de parafina, foram realizados cortes de 4 micra de espessura, que foram desparafinizados em estufa e reidratados em álcool. Foi procedida a recuperação antigênica em forno de microondas, a inativação da peroxidase endógena pela

imersão em peróxido de hidrogênio e o bloqueio das reações inespecíficas com soro normal. O anticorpo primário diluído em solução (1:50) foi encubado por 12 horas, a 4° C, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetrahydroclorido (Kit DAB, Dako). Um corte de carcinoma de pâncreas foi utilizado como controle positivo e, para controle negativo foi omitida a utilização do anticorpo primário.

Análise dos padrões de coloração

A análise da expressão do GRPR foi avaliada semi-quantitativamente conforme intensidade e distribuição, de forma similar à classificação preconizada por Scott e colaboradores ⁴⁹ : para intensidade 0: sem coloração; 1: fraca intensidade e 2: forte intensidade; para distribuição, focal: 1 (menos de 10 % das células coradas) e difuso: 2 (mais de 10 % das células coradas). As variáveis foram agrupadas de acordo com a soma da intensidade e da distribuição, formando quatro categorias (fraco e difuso, fraco e focal, forte e difuso, forte e focal) e conforme o escore total. Os espécimes foram classificados da seguinte maneira: fracamente positivas quando a soma dos padrões de distribuição e intensidade eram iguais a 2 e fortemente positivas, quando a soma atingia valores iguais ou maiores de três. Quando mais de um padrão de expressão estava presente na amostra era considerado aquele mais prevalente.

Análise estatística

A análise entre a expressão do GRPR em tecidos neoplásicos e mucosa hemorroidária foi realizada usando SPSS 18.0. A associação entre a expressão do GRPR no tumor e do tecido hemorroidário foi realizada usando o teste estatístico qui-quadrado (com correção de continuidade de Yates quando indicada) ou o teste exato de Fisher. O teste t de Student foi aplicado para avaliar a significância da diferença entre as médias de idade. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar a distribuição da pontuação coloração. O nível de significância foi de 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin. 2012 Jan-Feb; 62(1):10-29
- 2 Nigro ND, Vaitkevicius VK, Considine B Jr. *Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report*. Dis Colon Rectum. 1974 May-Jun;17(3):354-356.
- 3 Webb SP, Lee CS. *Epidermoid Cancer of the Anal Canal*. Clin Colon Rectal Surg. 2011 Sep;24(3):142-148
- 4 Contu SS, Agnes G, Damin AP, et al. *Lack of correlation between p53 codon 72 polymorphism and anal cancer risk*. World J Gastroenterol. 2009 Sep 28; 15(36):4566-4570
- 5 Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. *High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV negative homosexual and bisexual men*. AIDS 1998; 12:495-503
- 6 Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, et al. *Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer*. N Engl J Med 1997; 337: 1350-1358
- 7 Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. *Gastrin-releasing peptide and cancer*. Biochim Biophys Acta. 2006 Aug; 1766(1):23-41
- 8 Li X, Lv Y, Yuan A, Li Z. *Gastrin-releasing peptide links stressor to cancer progression*. J Cancer Res Clin Oncol. 2010 Apr; 136(4):483-491
- 9 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2012
- 10 Instituto Nacional de Câncer (INCA). Tipos de câncer no Brasil Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/anal>.

- 11 Robb BW, Mutch MG. *Epidermoid carcinoma of the anal canal*. *Clin Colon Rectal Surg*. 2006 May;19(2):54-60
- 12 Leonard D, Beddy D, Dozois EJ. *Neoplasms of anal canal and perianal skin*. *Clin Colon Rectal Surg*. 2011 Mar; 24(1):54-63
- 13 Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, et al. *Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions*. *Int J Cancer* 2009; 124: 2375-2383
- 14 Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. *Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update*. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-632
- 15 Blumetti J, Bastawrous AL. *Epidermoid cancers of the anal canal: current treatment*. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009 May; 22(2):77-83
- 16 Fritsch H, Zehm S, Illig R, Moser P, Aigner F. *New insights into the development and differentiation of the human anorectal epithelia. Are there clinical consequences?* *Int J Colorectal Dis*. 2010 October; 25(10): 1231–1242
- 17 Oliveira S, Teixeira L, Hoff PM, de Gramont A, Tournigand C. *Squamous-cell carcinoma of the anal canal: room for improvement with targeted therapy*. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012 Jun; 36(3):209-213
- 18 Call JA, Haddock MG, Quevedo JF, Larson DW, Miller RC. *Intensity-modulated radiotherapy for squamous cell carcinoma of the anal canal: efficacy of a low daily dose to clinically negative regions*. *Radiat Oncol*. 2011 Oct 6;6:134
- 19 Lampejo T, Kavanagh D, Clark J, Goldin R, Osborn M, Ziprin P, Cleator S. *Prognostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the anus: a systematic review*. *Br J Cancer*. 2010 Dec 7; 103(12):1858-1869
- 20 Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT. *Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008 Feb;15(1):58- 64

- 21 Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease, 1988 Lab Invest 59: 5-24,
- 22 Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombesina and Alytes. 1971 Experimentia 27: 166-169,
- 23 Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. Biochem Biophys Res Commun. 1983 Jul 29;114(2):541-8
- 24 McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. Biochem Biophys Res Comm 1979;90:277-82
- 25 Rozengurt E, Guha S, Sinnett-Smith J. *Gastrointestinal peptide signalling in health and disease* Eur J Surg Suppl. 2002; (587):23-38
- 26 Uehara H, González N, Sancho V, et al. Pharmacology and selectivity of various natural and synthetic Bombesin related peptide agonists for human and rat bombesin receptors differs. Peptides. 2011 Aug; 32(8):1685-99.
- 27 Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer. 2007 Feb;7(2):79-940
- 28 Hohla F, Schally AV. Targeting gastrin releasing peptide receptors: New options for the therapy and diagnosis of cancer. Cell Cycle. 2010 May; 9(9): 1738-41
- 29 Giladi E, Nagalla SR, Spindel ER. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. J. Mol. Neurosci., 1993 v.4, p.41-54.
- 30 Hellmich MR. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor- regulated secretion. J. Biol. Chem. 1999, Aug 20; 274(34):23901-9

- 31 Benya RV. Glycosilation of the gastrin-releasing peptide receptor and its effect on expression, G protein coupling, and receptor modulaty process. *Mol Pharmacol.* 2000 Dec; 58(6): 1490-501
- 32 Chave HS, Gough AC, Palmer K, Preston SR, Primrose JN. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *British Journal of Cancer.*2000, 82(1):124-30.
- 33 Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 159
- 34 Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006 Apr;5(2):197-204
- 35 Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, Roesler R, et al Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan10;109(2):547-52
- 36 Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, et al: BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology.*2010;79(5-6):430-9
- 37 Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007; 18: 1457–1466.
- 38 Heuser M, Schlott T, Schally AV, Kahler E, Schliephake R, Laabs SO, Hemmerlein.B. Expression of gastrin releasing Peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J Urol.* 2005 Jun;173(6):2154-9
- 39 Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985;316:823-826

- 40 Aprikian AG, Tremblay L, Han K, Chevalier S. 1997. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int. J. Cancer* 72:498–504
- 41 Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 1999; 155(6):2067-2076.
- 42 Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 2004;90(1):245-252
- 43 Sun B, Schally AV, Halmos G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul Pept.*2000 Jun 30; 90(1-3):77-84.
- 44 Pansky A, De Weerth A, Fasler-Kan E, Boulay JL, et al. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *Journal of the American Society of Nephrology.* 11(8):1409-18, 2000
- 45 Fang MZ, Liu C, Song Y, Yang GY, et al. Over-expression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis.* 25(6):865-71, 2004
- 46 Carroll RE, Carroll R, Benya RV. Characterization of gastrin-releasing peptide receptors aberrantly expressed by non-antral gastric adenocarcinomas. *Peptides* 1999;20(2):229-237
- 47 Wada M, Doi R, Hosotani R, Higashide S, et al. Effect of a new bombesin receptor antagonist, (E)-alkene bombesin isostere, on amylase release from rat pancreatic acini. *Pancreas.* 10(3):301-5, 1995
- 48 Szepeshazi K, Halmos G, Schally AV, Arencibia JM, et al Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptors during therapy with hormonal peptide analogs. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* 125 (8-9):444-52, 1999

- 49 Scott N, Millward E, Cartwright EJ, Preston SR, Coletta PL. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. *J Clin Pathol.* 2004 Feb;57(2):189-92
- 50 Lango MN, Dyer KF, Lui VW. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nat Cancer Inst* 2002 ; 94(5):375-383
- 51 Flores DG, Meurer L, Uberti AF, et al: Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Res Bull* 2010; 82: 95–98
- 52 Constantinides C, Lazaris AC, Haritopolous KN et al Immunohistochemical detection of gastrin releasing peptide in patients with prostate cancer. *World Journal of Urology*, 21(3): 183-187, 2003
- 53 Bartholdi, M F. Wu, J M. Pu, H. Troncoso, P. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *International Journal of Cancer.* 79(1):82-90, 1998
- 54 Chave, H S. Gough, A C. Palmer, K. Preston, S R. Primrose, J N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *British Journal of Cancer.* 82(1):124-30, 2000
- 55 Tell R, Rivera CA, Eskra J, Taglia LN, Blunier A, Wang QT, Benya RV. Gastrin-releasing peptide signaling alters colon cancer invasiveness via heterochromatin protein 1Hs β .
- 56 Saurin JC, Roualt JP, Abello J et al. High gastrin – releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35 (1): 125-132.
- 57 Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, Martinez M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate.* 2000 Mar 1;42(4):295-303

- 58 Egloff AM, Gaither Davis A, Shuai Y, et al Gastrin-releasing peptide receptor expression in non-cancerous bronchial epithelia is associated with lung cancer: a case-control study. *Respir Res.* 2012 Feb 1;13:9
- 59 Rivera CA, Ahlberg NC, Taglia L, Kumar M, Blunier A, Benya RV. Expression of GRP and its receptor is associated with improved survival in patients with colon cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(7):663-71
- 60 Carroll RE, Matkowskyj KA, Chakrabarti S, et al Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated colon cancers in humans. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1)
- 61 Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology.* 2007; 73(5-6):340-5.
- 62 Cornelio DB, Meurer L, Schwartzmann G, Roesler R. The gastrin-releasing peptide receptor as a marker of dysplastic alterations in cervical epithelial cells. *Oncology.* 2012; 82(2):90-7.
- 63 Abiraj K, Mansi R, Tamma ML, Fani M, Forrer F, Nicolas G, Cescato R, Reubi JC, Maecke HR. Bombesin antagonist-based radioligands for translational nuclear imaging of gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors. *J Nucl Med.* 2011 Dec; 52(12):1970-8.
- 64 Scopinaro F, Di Santo GP, Tofani A, Massari R, ET al. Fast cancer uptake of ^{99m}Tc-labelled bombesin (^{99m}Tc BN1). *In Vivo.* 2005 Nov-Dec; 19(6):1071-6. 34.
- 65 Zhang H, Abiraj K, Thorek DL, Waser B, et al Evolution of bombesin conjugates for targeted PET imaging of tumors. *PLoS One.* 2012; 7(9):e44046. Epub 2012 Sep 14
- 66 Nagy A, Armatis P, Cai RZ, Szepeshazi K, Halmos G, Schally AV: Design, synthesis, and in vitro evaluation of cytotoxic analogs of bombesin-like peptides containing doxorubicin or its intensely potent derivate, 2-pyrrolinodoxorrubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 652-656, 1997.

- 67 Lears KA, Ferdani R, Liang K, Zheleznyak A, et al. In vitro and in vivo evaluation of ⁶⁴Cu-labeled SarAr-bombesin analogs in gastrin-releasing peptide receptor-expressing prostate cancer. *J Nucl Med.* 2011 Mar; 52(3):470-477.
- 68 Safavy A, Khazaeli MB, Qin H, Buchsbaum DJ: Synthesis of bombesin analogues for radiolabeling with rhenium-188. *Cancer* 1997 80: 2354-2359,.
- 69 Lantry LE, Cappelletti E, Maddalena ME, et al. ¹⁷⁷Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med.* 2006 Jul; 47(7):1144-52.
- 70 Kahan Z, Sun B, Schally AV et al. 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* 2000; 88 (6): 1384–1392
- 71 Abujamra AL, Almeida VR, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastomacell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biol Int.* 2009Aug; 33(8):899-903.
- 72 Plonowski A, Schally AV, Varga JL et al. Potentiation of the inhibitory effect of growth hormone-releasing hormone antagonists on PC-3 human prostate cancer by bombesin antagonists indicative of interference with both IGF and EGF pathways. *Prostate* 2000; 44 (2): 172–180
- 73 Chatzistamou I, Schally AV, Sun B et al. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer* 2000;83:906-13
- 74 Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, et al. Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of k-ras, cox-2 and pAkt. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1871-6
- 75 Bajo AM, Schally AV, Krupa M, et al Bombesinantagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the

expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3836-41.

- 76 Sotomayor S, Muñoz-Moreno L, Carmena MJ, Schally AV, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Bajo AM. Regulation of HER expression and transactivation in human prostate cancer cells by a targeted cytotoxic bombesin analog (AN-215) and a bombesin antagonist (RC-3095). Int J Cancer. 2010 Oct 15;127(8):1813-22
- 77 De Farias CB, Stertz L, Lima RC, Kapczinski F, Schwartzmann G, Roesler R. Reduced NGF secretion by HT-29 human colon cancer cells treated with a GRPR antagonist. Protein Pept Lett. 2009;16(6):650-2
- 78 Petronilho F, Vuolo F, Galant LS, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonism induces protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling. Mol Med. 2012 Oct 24; 18:1209-19
- 79 Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. Arthritis Rheum. 2011 Oct;63(10):2956-65
- 80 Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM, Roesler R, Schwartzmann G. Effects of the gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in a rat model of ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 2010 Aug;55(8):2203-10
- 81 Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. Invest New Drugs 2006;24(5):403-412

ARTIGO CIENTÍFICO

Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Epidermoid Carcinoma of the Anal Canal

ANEXO

Mar 13, 2013

RE: AIMM-131197R1, entitled "EXPRESSION OF GASTRIN-RELEASING PEPTIDE RECEPTOR IN EPIDERMOID CARCINOMA OF THE ANAL CANAL"

Dear Professor Damin,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

With Kind Regards,

**DR. CLIVE TAYLOR
Editor**

Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology

ARTIGO ORIGINAL

APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY

Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Epidermoid Carcinoma of the Anal Canal

Fabíola F. Martins, MD,* Paulo C. Contu, MD, PhD,* Luise Meurer, MD, PhD,†

Gilberto Schwartzmann G, MD, PhD, ‡ Daniel C. Damin, MD, PhD.*

* Division of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

† Department of Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

‡ Division of Oncology, Department of Internal Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Reprints: Prof. Daniel C. Damin, MD, PhD, Division of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Address: Rua Ramiro Barcelos 2350, sala (room) 600, Porto Alegre, RS, Brazil, postal code 90 035-903. E-mail: damin@terra.com.br. Phone: 55-51-9602 0442. Fax: 55-51-3359 8001

Conflicts of Interest: the authors declare no conflict of interest.

Source of Funding: This work was supported by FIPE (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The authors did not receive fundings for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Welcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

ABSTRACT

Gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuroendocrine peptide that demonstrated important growth-stimulatory effects in various types of cancer. High expression of GRP receptors have been found in different malignancies, and studies exploring the therapeutic use of GRP receptor (GRPR) antagonists have presented promising results. Our aim was to determine the GRPR expression in epidermoid carcinoma of the anal canal and discuss its potential clinical applications. We performed immunohistochemistry for GRPR on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples obtained from 35 patients with anal cancer. As a control group, we analyzed 24 samples of non-malignant anal tissues (hemorrhoidectomy specimens). GRPR expression was evaluated using a semi-quantitative approach according to intensity and distribution of staining. All analyzed tissues, except one control sample, showed positive GRPR immunoexpression. GRPR was strongly expressed in 54% of cancer specimens as compared with only 12% of the control specimens ($P < 0.003$). In tumors, the receptor demonstrated a diffuse and homogeneous pattern of distribution within the specimens. In contrast, control specimens showed a focal pattern of staining restricted to the basal half of epithelium. In conclusion, we showed that GRPR is highly expressed in epidermoid carcinoma of the anal canal, suggesting this receptor might have a role in anal carcinogenesis. Our results provide a basis for exploiting GRPR as a target for diagnostic and therapeutic purposes in anal carcinoma.

Keywords: gastrin releasing receptor; anal canal; epidermoid carcinoma; bombesin; immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Anal cancer is a relatively uncommon malignancy, with an estimated 6230 new cases and 780 deaths in the United States in 2012.¹ Globally, annual incidence rates of invasive anal cancer range from 0.1 to 2.8 cases per 100 000 among men and 0.0-2.2 cases per 100 000 among women². Epidermoid carcinoma is the most common type of cancer, representing 80-85% of the malignant tumors of the anal canal.²⁻⁴ This includes squamous cell carcinoma and its variants (cloacogenic, basaloid and transitional carcinomas). Keratinizing and nonkeratinizing histology may be seen, depending on the origin of the tumor in relation to the transition zone, but their treatment and outcome are similar.⁵

Although many risk factors for the development of anal cancer have been identified, such as the practice of receptive anal intercourse and immunodeficiency, the molecular mechanisms related to anal carcinogenesis remain unclear. It has been demonstrated, however, that anal cancer has several etiological similarities with invasive cervical cancer. Both tumors have well-documented precursors (intraepithelial neoplasia) and both have been causally linked to high-risk human papillomavirus (HPV) infection.⁶⁻⁸ According to a recent review, HPV is detected in 71% of invasive anal cancers, with approximately 72% of the HPV-positive cases being associated with HPV 16 and/or 18 infection. This estimate of HPV 16 and 18 prevalence is equivalent to that found in invasive cervical cancer.^{9,10} Thus, potential biomarkers involved in cervical carcinogenesis may also be important in development of the anal cancer.

A recent study evaluated the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) in specimens of cervical cancer. Using immunohistochemistry, it was demonstrated a high expression of GRPR in cancer specimens, suggesting this receptor may play a role in cervical carcinogenesis.¹¹ GRP is a neuroendocrine peptide that belongs to a bombesin like peptide (BLP) family on mammalian. Several lines of experimental evidence have suggested that GRP may act as a growth factor in different types of cancer.¹²⁻¹⁴ For that reason, GRP-preferring receptor antagonists have been developed as anticancer candidate compounds, exhibiting impressive antitumor activity both in vitro and in vivo in various tumors. Notably, the inhibition of GRPR was demonstrated to interfere with relevant growth factor pathways such as the EGF- and VEGF-dependent signaling pathways.¹⁵⁻¹⁶

GRPR overexpression has been demonstrated in a wide variety of cancers, including breast,^{15,17} , ovary,¹⁸ lung,¹⁹ colon,²⁰⁻²² and esophageal carcinoma.²³ Despite the promising results seen in cervical cancer, no studies have evaluated the GRPR expression in anal cancer to this date. The aim of the present study was to examine whether GRPR is expressed in squamous cell carcinomas of the anal canal and to verify if there is a significant difference in its expression between malignant and non-malignant anal tissues.

MATERIALS AND METHODS

Cases and Controls

Thirty-five patients with histological confirmed primary epidermoid carcinoma of the anal canal (25 female and 10 males, mean age 56.0 years, range 40-80 years) were enrolled in the study. As a non-malignant control group, we studied 24 patients submitted to conventional hemorrhoidectomy (12 male and 12 female, mean age 50, 8 years, 35-65 years). There were no significant differences between cases and controls regarding age and gender ($p=0,111$ and $p=0,163$, respectively).

All patients and controls were treated at Division of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, between 2002 and 2012. The study was approved by our Institutional Research Ethics Committee.

Immunohistochemistry

All 35 archival anal cancer specimens were retrieved from paraffin blocks containing biopsies with epidermoid carcinoma, which were obtained for diagnostic purposes before the patients had been submitted to radiotherapy. The hemorrhoidectomy specimens were selected for the analysis if they contained normal transition zone, where the pathologist assessed the immunohistochemical reaction.

The GRPR expression analysis was performed using a rabbit anti-GRPR polyclonal antibody (ab39883, Abcam - Cambridge, MA, USA) as primary antibody. The immunohistochemical methods have been described previously.¹¹ In brief, the blocks were cut into 4- μ m-thick sections and mounted on microscope slides. After

dewaxing, inactivating endogenous peroxidase activity and blocking cross-reaction with normal serum, 4 µm sections were incubated overnight at 4° C with a diluted solution of the primary antibody (1:400). Identification of primary antibody location was achieved by subsequent application of biotinylated antibody, streptavidin horseradish peroxidase conjugate (LSAB, Dako) and diaminobenzidine tetrahydrochloride/H₂O₂ (kit DAB, Dako Staining). A known pancreatic cancer was used as positive control and the negative control was obtained by omitting the primary antibody.

Assessment of staining patterns

In the immunohistochemical analysis, positive cytoplasmic or nuclear staining reactions appeared as brown spots. Immunohistochemical staining was evaluated using a semi-quantitative approach according to intensity and distribution. For data presentation, a similar classification to that of Scott et al.²⁴ was used: 0 = no staining; 1 = weak staining; 2 = strong staining; 1 = focal pattern distribution of staining (< 10% of cells stained); 2 = diffuse pattern of cell staining (>10% of cells stained). Specimens showing tumor areas with different staining intensities were scored according to the most prevalent intensity. Variables were grouped according to intensity and distribution, forming 4 categories (weak diffuse, weak focal, strong diffuse, strong focal). A specimen was also classified as weak positive when its intensity plus distribution scores were 2 or as strong positive when its intensity and distribution scores were 3 or 4.

Statistical analysis

Analysis between GRPR expression in neoplastic tissues and hemorrhoidal mucosa was performed using SPSS 18.0. Association between GRPR expression in tumor and hemorrhoid was assessed using the chi-square test (with Yates continuity correction whenever indicated) or the Fisher exact test. The t-student test was used to assess the significance of the difference between the mean ages. The Mann-Whitney test was used for comparison of the staining score distribution. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

All analyzed tissues, except one hemorrhoid case, showed positive GRPR immunoexpression, appearing as cytoplasmic staining. GRPR was more expressed in anal carcinomas than in hemorrhoids, with the mean scores of 3.45 and 2.04, respectively ($p < 0.001$).

In table 1, we show the results of GRPR expression according to its distribution within the tissues. In tumors, the receptor demonstrated mostly a diffuse pattern with a homogeneous distribution within the specimens. In contrast, hemorrhoid specimens showed a focal pattern of staining, particularly restricted to the basal half of epithelium (Figure 1). Table 2 displays the results of GRPR expression according to intensity of staining.

Table 1. GRPR distribution within tissues

	GRPR expression		
	Neg.	Focal	Diffuse
Hemorrhoids	1(4.2%)	23 (95.8%)	0 (0%)
Anal carcinomas	0 (0%)	3 (8.6%)	32 (91.4%)

$P < 0.001$

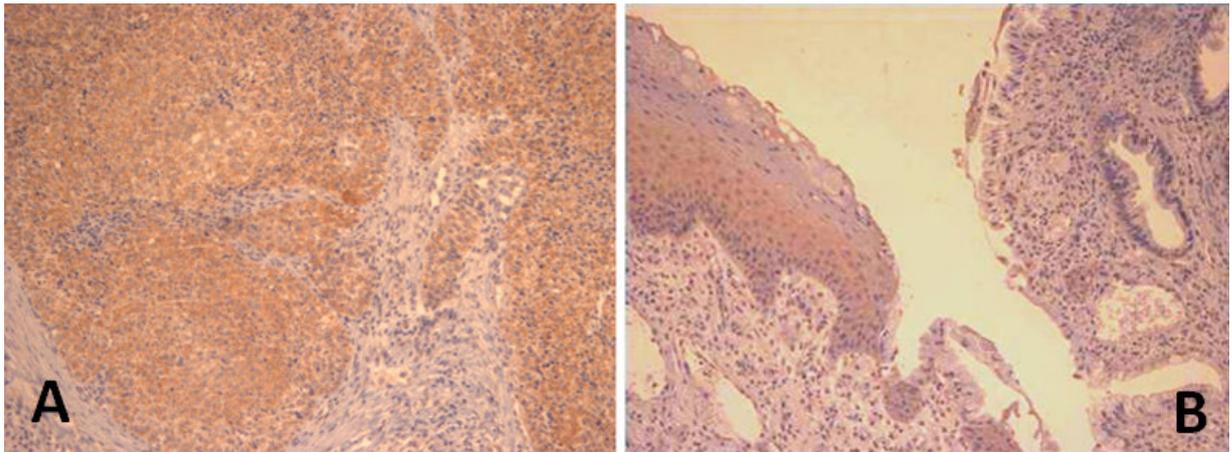


Figure1. Typical GRPR immunoexpression in a cancer specimen (A) and in a hemorrhoid specimen (B). 200x

Table 2. GRPR expression according to staining intensity

	Expression intensity		
	Neg.	Strong staining	Weak staining
Hemorrhoids	1(4,2%)	3 (12,5%)	20 (83,3%)
Anal carcinomas	0 (0%)	19 (54,3%)	16 (45,7%)

P=0.003 Neg=Negative

A significant difference in the general pattern of GRPR expression between cancers and controls was demonstrated: strong and diffuse in anal cancers and weak and focal in hemorrhoids (Figure 2). Only 2 of the 35 tumors (6%) were weakly positive as compared with 20 of 24 (87%) of the hemorrhoid cases. No significant differences in GRPR expression were seen among the different histological variants of epidermoid tumor (cloacogenic, basaloid, well or poorly-differentiated carcinomas).

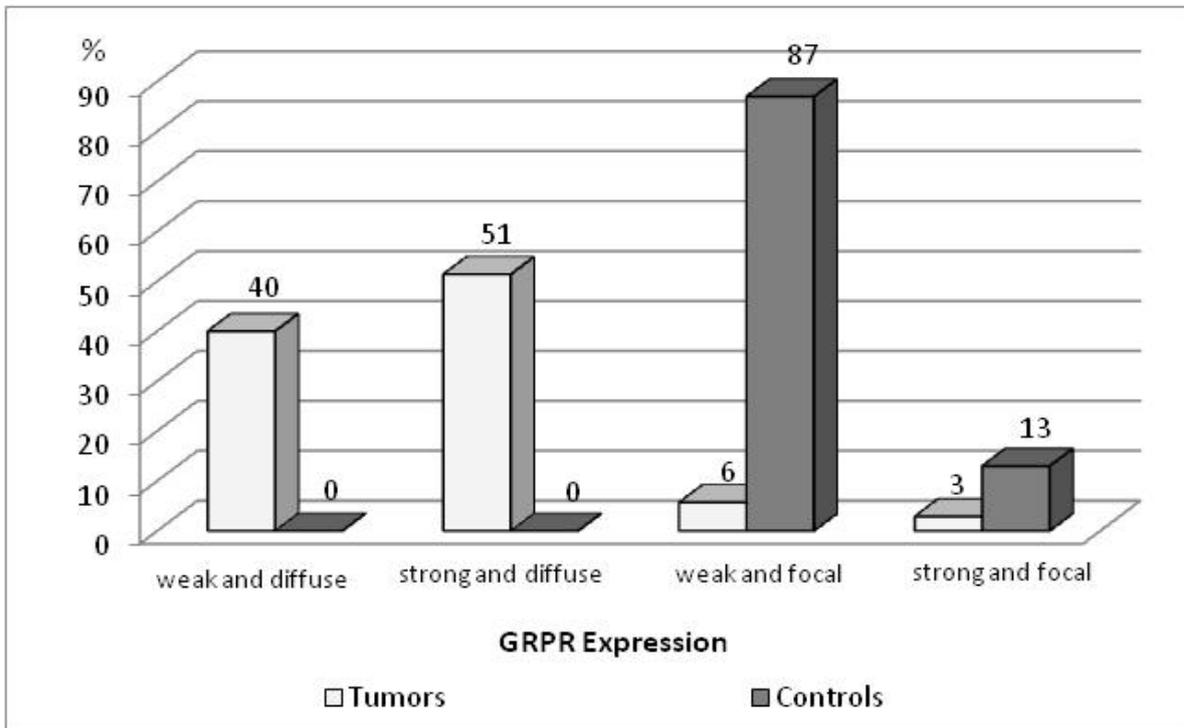


Figure 2. General GRPR patterns of expression.

DISCUSSION

Since 1974, when Nigro introduced his protocol of treatment, chemo-radiotherapy has replaced abdominoperineal resection as the standard of care for epidermoid carcinoma of the anal canal.^{5,25} This treatment achieves higher rates of survival along with sphincter preservation, sparing most patients the morbidity of a permanent stoma. Surgery is currently reserved for patients with unresponsive or relapsing tumors after multimodality therapy.^{5,26} Despite the success of chemoradiotherapy, significant side effects can be expected and there is heterogeneity in treatment response between patients, suggesting that new options of diagnosis and treatment should be explored.

GRP is the mammalian homologue of bombesin, a tetradecapeptide originally isolated from frog skin. GRP and bombesin share a highly conserved amino-acid sequence, which is responsible for their similar immunogenicity and binding receptor (GRPR), consequently performing identical physiologic functions. GRPR, found in the gut (from esophagus to rectum), influences secretion of enteric peptide hormones and pancreatic exocrine secretions and regulates gut motility. The GRP/GRPR complex can also play a role in pathways of memory, psychiatric and neurologic disorders.^{13,20,27,28} Preclinical studies have shown that GRP possesses important immune-regulatory functions, such as chemo-attraction of macrophages and lymphocytes, and stimulation of cell mediated cytotoxicity and natural killer activity.²⁸

GRPR has also been studied as a potential target for both cancer diagnosis and treatment. Several studies have suggested that GRP may play a role in development

of different types of cancer, such as prostate, breast, ovary, lung, head and neck, gastric, colon, esophageal and renal cancers.^{13,29} Recent data indicate that GRP also has paracrine and endocrine effects and functions as a morphogen and a proangiogenic agent. Inhibition of GRPR was demonstrated to interfere with relevant growth factor pathways such as the epidermal growth factor- and vascular endothelial growth factor-dependent signaling pathways.^{13, 19, 30}

One particularly important study was conducted by Cornelio et al.¹¹ Using immunohistochemistry for GRPR, the authors evaluated whether cervical carcinomas and adjacent tissues express the GRPR and whether there is a significant difference in its distribution among preinvasive and invasive cervical cancers. GRPR was detected in 99% of tumor specimens, mostly exhibiting a diffuse strong staining. The receptors were seldom detected in the endocervices, while ectocervices expressed GRPR only when adjacent to neoplastic lesions. Their data provided a molecular basis for exploiting GRPR as a target for diagnostic and therapeutic purposes in cervical neoplasms.

In a more recent study, the same research group evaluated the diagnostic potential of GRPR immunocytochemistry in detecting cervical dysplasia and invasive cancer. Cervical smears were collected from 66 women in Brazil and subjected to GRPR immunocytochemistry and the Pap test. GRPR immunohistochemistry was performed in biopsies if abnormalities were detected. GRPR immunostaining sensitivity in detecting cervical lesions was 87.5% and its specificity was 76.7%. GRPR immunostaining showed 80% accuracy in identifying atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), with 88% sensitivity and 71% specificity. The

ability of GRPR immunostaining to detect cervical lesions was 10.1% higher than that of the Pap test, with a gain of 11.1% in specificity.

Cervical and anal carcinomas have several etiological similarities. In a mechanism that is identical to cervical intraepithelial neoplasia, high-risk HPVs cause anal intraepithelial neoplasia that progresses from low-grade to high-grade dysplasia and ultimately to invasive cancer, providing a basis for early diagnosis and intervention. Based on the impressive results obtained in patients with cervical cancer, we decided to study the GRPR in anal cancer.

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the GRPR expression in carcinoma of the anal canal. We were able to demonstrate a stronger and more diffuse GRPR expression in tumors compared with non-malignant control samples. Because most carcinomas of the anal canal arise from transition zone, close to the dentate line, only hemorrhoidectomy specimens that included transitional epithelium were selected for the analysis. Because different types of epithelium are found in the anal canal, the control group had the immunohistochemical staining assessed only in those areas in which the transition zone could be identified.

Our series are in line with studies that found a high GRPR expression in epidermoid carcinomas arising from other anatomical sites.^{23,31} About 54% of our cancer specimens showed a strong level of GRPR expression, as compared with only 12% of the control specimens. These results suggest that GRPR might be involved in the process of anal carcinogenesis. Although somewhat limited by sample size, our findings also suggest that patients with epidermoid carcinoma of the anal canal might

be potential candidates to be considered for inclusion in future clinical trials with GRPR antagonists. RC-3095 is an example of a synthetic GRPR antagonist, which exhibited a favorable toxicity profile and important anti-tumor activity in preclinical models.¹³ In our institution, a phase I trial with RC-3095 was conducted in patients with advanced malignancies, confirming its favorable toxicity profile.³²

At this moment, it is not clear if the GRPR expression in anal cancer might influence tumor outcome or response to treatment. Despite its relatively low incidence, carcinoma of the anal canal is an aggressive disease when non-responsive to initial treatment, presenting high morbimortality. Our findings suggest that GRP analogues and GRPR antagonists should be considered potential therapeutic targets in future clinical studies evaluating patients with this type of cancer. It should be pointed out, however, that our data need to be substantiated with additional studies involving a larger number of patients. Further studies on this subject are warranted.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CANAL ANAL

Fabíola Fernandes. Martins, *Dr. Paulo de Carvalho Contu,* Prof^a Dr^a Luise Meurer,
† Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann, ‡ Prof. Dr. Daniel de Carvalho. Damin.*

* Serviço de Coloproctologia, Departamento de Cirurgia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

† *Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

‡ *Serviço de Oncologia, Departamento de Medicina Interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

RESUMO

O Peptídeo Liberador de Gastrina é um peptídeo neuroendócrino que tem importante atividade como fator de crescimento em diferentes tipos de cânceres. A expressão aumentada do GRP tem sido documentada em várias neoplasias, e estudos sobre uso terapêutico do bloqueio dos receptores do GRP (GRPR) têm apresentado resultados promissores. Nosso objetivo foi determinar a expressão do GRPR no carcinoma epidermóide de canal anal e discutir suas potenciais aplicações clínicas. Foi realizada análise imunoistoquímica em blocos de parafina com amostras tumorais de 35 pacientes com câncer anal. Como grupo controle não maligno, analisamos 24 amostras de tecidos anais (anatomopatológicos de hemorroidectomias). A expressão do GRPR foi avaliada utilizando uma abordagem semi-quantitativa de acordo com a intensidade e distribuição da coloração. Todos os tecidos analisados, com exceção de uma amostra controle, apresentaram imunoexpressão positiva do GRPR. O GRPR teve forte expressão em 54% das amostras tumorais e em somente 12% das amostras do grupo controle ($P < 0.003$). Nos tumores, o receptor demonstrou um padrão de distribuição difuso e homogêneo. Em contraste, as amostras do grupo controle apresentaram um padrão de coloração focal restrito à metade mais profunda da camada basal do epitélio. Em conclusão, demonstramos que o GRPR é altamente expresso no carcinoma epidermóide do canal anal, o que sugere que este receptor possa desempenhar um papel na carcinogênese anal. Nossos resultados fornecem uma base para a exploração do receptor de gastrina como um alvo diagnóstico e terapêutico no carcinoma anal.

Palavras chave: peptídeo liberador de gastrina, bombesina, câncer anal, epidermóide, imunoistoquímica.

INTRODUÇÃO

O câncer de canal anal é uma neoplasia maligna relativamente rara, estimando-se 6230 novos casos e 780 mortes nos Estados Unidos em 2012.¹ Globalmente, a incidência anual para o câncer invasivo varia de 0,1 a 2,8 casos por 100.000 em homens e 0,0 a 2,2 casos por 100,000 mulheres.² O carcinoma epidermóide é o tipo histológico mais comum, representando 80-85% dos casos de tumores malignos no canal anal, o que inclui o carcinoma escamoso e suas variações (basalóide, cloacogênico e carcinoma de células transicionais).²⁻⁴ Variantes histológicas com ou sem queratinização podem ocorrer, dependendo da origem do tumor em relação à zona de transição, porém o comportamento biológico e tratamento destas neoplasias são semelhantes.⁵

Apesar de muitos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de canal anal terem sido identificados, como a prática de intercurso anal receptivo e imunodeficiências, os mecanismos moleculares relacionados à carcinogênese anal permanecem desconhecidos. Foi demonstrado, entretanto, que o câncer anal tem diversas características etiológicas similares ao câncer cervical invasivo. Ambos os tumores tem a neoplasia intraepitelial como precursora e apresentam a infecção pelo HPV como fator etiológico.⁶⁻⁸ De acordo com uma recente revisão, o HPV é detectado em 71% dos cânceres anais invasivos, sendo 72% dos casos HPV positivos associados à infecção pelo HPV 16 ou 18. Esta estimativa é semelhante há encontrada no câncer cervical.^{9,10} Desta forma, os biomarcadores potencialmente envolvidos na carcinogênese de cérvix podem também ser importante no câncer anal.

Um estudo recente avaliou o receptor liberador de gastrina (GRPR) em espécimes de câncer cervical uterino. Usando imunistoquímica, foi demonstrada elevada expressão do GRPR nas amostras neoplásicas, sugerindo que o receptor tenha um papel na carcinogênese de cérvix de colo de útero.¹¹ O GRP é um peptídeo neuroendócrino que pertence a família de peptídeos semelhantes a bombesina (BLP) nos mamíferos. Diversas linhas de evidência experimental têm sugerido que o GRP atua como um fator de crescimento em diversos tipos de câncer.¹²⁻¹⁴ Por esta razão, antagonistas do receptor de GRP preferencial, têm sido desenvolvidos como candidatos em composto anticâncer, exibindo expressiva atividade antitumoral tanto em vitro quanto in vivo. Notavelmente, foi demonstrado que a inibição do GRPR interfere na atividade de fatores de crescimento como EGF e VEGF.¹⁵⁻¹⁶

A superexpressão do GRPR tem sido demonstrada numa gama de tumores, incluindo mama,^{15,17} ovário,¹⁸ pulmão,¹⁹ cólon,²⁰⁻²² e carcinoma de esôfago.²³ Apesar dos resultados promissores no câncer cervical, nenhum estudo avaliou a expressão do GRPR em câncer de canal anal até o presente momento. O objetivo deste estudo foi, portanto, examinar se há expressão do GRPR no carcinoma escamoso de canal anal. Buscamos também verificar se existe diferença na expressão de GPRR entre amostras de câncer anal e tecidos não malignos do canal anal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casos e Controles

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de canal anal provenientes do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2002 a 2012. Como controles, foram avaliados anatomopatológicos de hemorroidectomias do mesmo serviço. Amostras de pacientes HIV positivo e espécimes de hemorróidas sem a zona de transição do canal anal na amostra foram excluídos do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

A amostra mais representativa de cada caso foi selecionada pelo patologista e submetida à imunoistoquímica.

Imunoistoquímica

A análise da expressão do GRPR foi feita utilizando-se um anticorpo anti-GRPR policlonal de coelho (nº de catálogo ab39883, Abcam - Cambridge, MA USA) na diluição 1:400. Nos blocos de parafina, foram realizados cortes de 4 micra de espessura, que foram desparafinizados em estufa e reidratados em álcool. Foi procedida a recuperação antigênica em forno de microondas, a inativação da peroxidase endógena através da imersão em peróxido de hidrogênio e o bloqueio das reações inespecíficas com soro normal. O anticorpo primário diluído em solução (1:50) foi encubado por 12 horas, a 4° C, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetrahydroclorido (Kit DAB, Dako). Um corte de carcinoma de pâncreas foi utilizado

como controle positivo e, para controle negativo foi omitida a utilização do anticorpo primário.

A análise da expressão do GRPR foi avaliada semi-quantitativamente conforme intensidade e distribuição, de forma similar à classificação preconizada por Scott et al ²⁴ para intensidade, 0: sem coloração; +1: fraca intensidade; + 2: forte intensidade; para distribuição: focal: +1 (menos de 10 % das células coradas) e difuso: + 2 (mais de 10 % das células coradas). As variáveis foram agrupadas de acordo com intensidade e distribuição, formando quatro categorias (fraco e difuso, fraco e focal, forte e difuso, forte e focal) e conforme o escore total. Os espécimes foram classificados da seguinte maneira: fracamente positivas quando a soma dos padrões de distribuição e intensidade fossem iguais a 2 e fortemente positivas, quando a soma atingia valores iguais ou maiores de três. Quando mais de um padrão de expressão estava presente na amostra foi considerado aquele mais prevalente.

Análise estatística

A análise entre a expressão do GRPR em tecidos neoplásicos e mucosa hemorroidária foi realizada usando SPSS 18.0. A associação entre a expressão do GRPR no tumor e do tecido hemorroidário foi realizada usando o teste estatístico qui-quadrado (com correção de continuidade de Yates quando indicada) ou o teste exato de Fisher. O teste t de Student foi aplicado para avaliar a significância da diferença entre as médias de idade. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar a distribuição da pontuação coloração. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Trinta e cinco pacientes com confirmação histológica de carcinoma epidermóide primário do canal anal (25 mulheres e 10 homens, com média de idade de 56 anos, variando de 40 a 80 anos) foram incluídos no estudo. Como grupo controle não maligno foram avaliadas 24 amostras de anatomopatológico de hemorroidectomia (12 homens e 12 mulheres com média de idade de 50,8 anos, variando de 35 a 65 anos) Não houve diferenças significativas entre casos e controles quanto à idade e gênero ($p = 0,111$ e $p = 0,163$, respectivamente).

Todos os tecidos analisados, com exceção do grupo controle, mostraram positividade para imunoexpressão do GRPR no citoplasma. O GRPR foi mais expressado nos carcinomas anais do que nas hemorróidas, com as médias de escores totais de 3,45 e 2,04, respectivamente ($p < 0,001$).

Na tabela 1, os resultados da expressão do GRPR conforme a distribuição nos tecidos. Nos tumores o receptor demonstrou um padrão de distribuição mais difuso e homogêneo. Em contraste, espécimes hemorroidárias mostraram um padrão de coloração focal, particularmente restrito a metade da camada basal. do epitélio (figura 1). A tabela 2 mostra os resultados de expressão do GRPR de acordo com a intensidade da coloração.

Tabela 1. Distribuição do GRPR nos tecidos

	Expressão de distribuição GRPR		
	Neg.	Focal	Difuso
Hemorróidas	1(4,2%)	23 (95,8%)	0 (0%)
Carcinomas anal	0 (0%)	3 (8,6%)	32 (91,4%)

P< 0,001

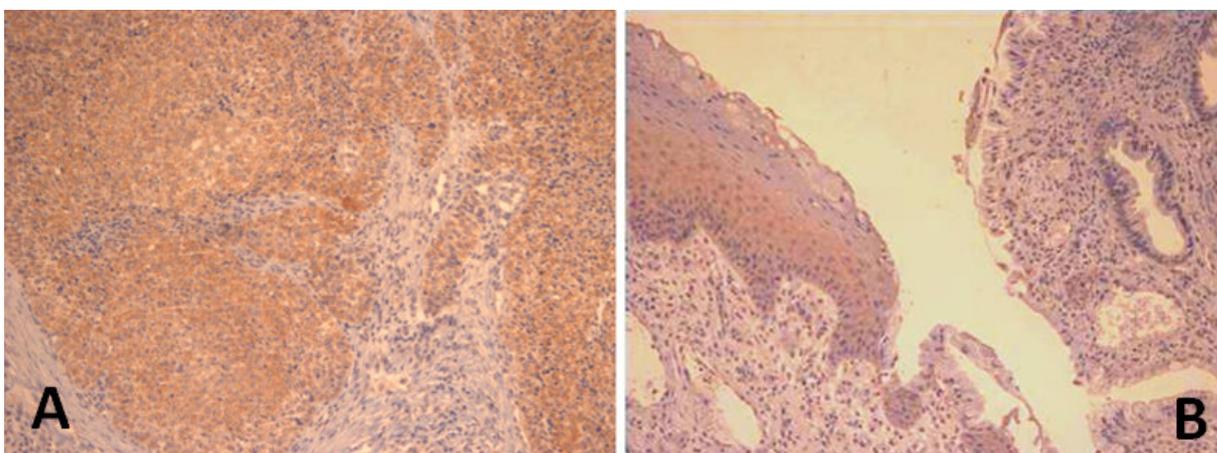


Figura 1. Típica imunoexpressão do GRPR em espécimes tumorais (A) e em espécimes hemorroidárias(B).

Tabela 2. Expressão do GRPR conforme a intensidade de coloração

	Intensidade de expressão		
	Neg.	Forte intensidade	Fraca intensidade
Hemorróidas	1(4,2%)	3 (12,5%)	20 (83,3%)
Carcinoma Anal	0 (0%)	19 (54,3%)	16 (45,7%)

P=0,003

Uma diferença significativa no padrão geral de expressão entre casos e controles foi encontrada: padrão forte e difuso nas amostras tumorais e fraco e focal nas amostras hemorroidárias (Figura 2). Somente 2 dos 35 casos (6%) apresentaram imunocoloração fraca e focal enquanto 20 dos 24 controles (87%) apresentaram tal padrão. Nenhuma diferença significativa de expressão do GRPR foi encontrada quando comparadas diferentes variantes histológicas de tumor epidermóide (cloacogênico, basalóide, carcinoma bem diferenciado e pobremente diferenciado).

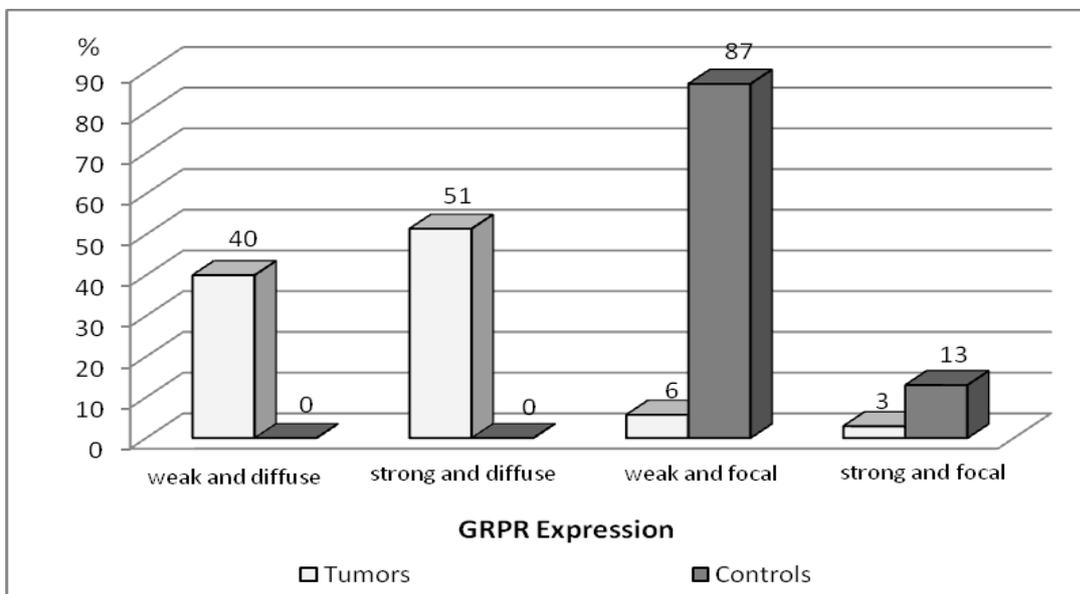


Figura 2. Padrão geral de expressão do GRPR

DISCUSSÃO

Desde 1974, quando Nigro apresentou seu protocolo de tratamento, a quimiorradioterapia substituiu a amputação abdominoperineal como tratamento padrão para carcinoma epidermóide de canal anal.^{5,25} Essa modalidade terapêutica obtém maiores índices de sobrevida além de preservação esfinteriana, poupando a maioria dos pacientes da morbidade de um estoma permanente. A Cirurgia é atualmente reservada para pacientes com neoplasias não responsivas ou recidivadas após a terapia multimodal.^{5,26} Apesar do sucesso da quimiorradioterapia, significativos efeitos adversos podem ocorrer e existe certa heterogeneidade na resposta terapêutica entre os pacientes, sugerindo-se que novas opções de diagnóstico e tratamento devam ser exploradas.

O GRP é o homólogo mamário da bombesina, um tetradecapeptídeo originalmente isolado da pele de sapo. GRP e bombesina dividem uma sequência de aminoácidos altamente conservada que é responsável por sua imunogenicidade similar e ligação ao receptor (GRPR), conseqüentemente desempenhando funções fisiológicas idênticas. O GRPR, encontrado no trato gastrointestinal (do esôfago ao reto), influencia na secreção de hormônios peptídeos entéricos e secreções pancreáticas exógenas e regula a motilidade intestinal. O complexo GRP/GRPR também desempenha papel em vias de memória, desordens psiquiátricas e neurológicas.^{13, 20, 27, 28} Estudos pré-clínicos têm mostrado que GRP possui importantes funções imuno-regulatórias, como quimioatração de macrófagos e linfócitos, e estimulação de citotoxicidade celular e atividade de natural killers.²⁸

GRPR também tem sido estudado como um potencial alvo tanto para diagnóstico como para tratamento do câncer. Vários estudos sugerem que GRP pode desempenhar um papel no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, como próstata, mama, ovário, pulmão, cabeça e pescoço, estômago, cólon, esôfago e rim.^{13,29} Dados recentes indicam que GRP também tem efeitos parácrinos e endócrinos além de funcionar como agente morfógeno e proangiogênico. A inibição do GRPR demonstrou interferir com vias de fator de crescimento relevantes, como às sinalizadoras do fator de crescimento epidermal e de fator de crescimento vascular endotelial.^{13,19,30}

Um estudo particularmente importante foi conduzido por Cornelio e colaboradores.¹¹ Utilizando imunistoquímica para GRPR. Os autores avaliaram se carcinomas cervicais e de tecidos adjacentes expressam o GRPR e se existe uma diferença significativa na sua distribuição entre carcinomas cervicais pré-invasivos e invasivos. O GRPR foi detectado em 99% dos espécimes tumorais, na sua maioria expressando intensa coloração difusa. Os receptores foram raramente detectados nas endocérvices, enquanto ectocérvices expressaram GRPR apenas quando adjacentes a tecidos neoplásicos. Esses dados forneceram base molecular para explorar GRPR como alvo diagnóstico e terapêutico em neoplasias cervicais.

Em estudo mais recente, o mesmo grupo de pesquisa avaliou o potencial diagnóstico da imunocitoquímica do GRPR na detecção das displasias cervicais e câncer invasivo. Amostras cervicais coletadas de 66 mulheres foram submetidas à imunocitoquímica para GRPR e exame de Papanicolau. A imunistoquímica do GRPR foi realizada se anormalidades eram detectadas. A sensibilidade da

imunocoloração para GRPR na detecção de lesões cervicais foi 87,5% e sua especificidade foi de 76,7%. GRPR demonstrou 80% de acurácia na identificação de células escamosas atípicas de significado incerto (ASCUS), com 88% de sensibilidade e 77% de especificidade. A habilidade da imunocoloração do GRPR na detecção de lesões cervicais foi 10,1% maior que o exame de Papanicolau com ganho de 11,1% na especificidade.

Os carcinomas anais e cervicais têm diversas similaridades etiológicas. Em um mecanismo que é idêntico à neoplasia intraepitelial cervical, HPVs de alto risco causam neoplasia intraepitelial anal que progride de displasia de baixo grau para alto grau e finalmente para câncer invasivo, fornecendo base para diagnóstico precoce e intervenção. Com base nos expressivos resultados obtidos em pacientes com câncer cervical, nós decidimos estudar o GRPR em câncer anal.

Este é o primeiro estudo a investigar a expressão do GRPR no carcinoma de canal anal. Conseguimos demonstrar uma expressão mais intensa e difusa do GRPR nesses tumores comparados a amostras não tumorais dos controles. Devido ao fato de que tumores de canal anal originam-se mais comumente da zona de transição próximo à linha pectínea, apenas espécimes de hemorroidectomia que incluíam o epitélio transicional foram selecionados. Como diferentes tipos de epitélio são encontrados no canal anal, o grupo controle teve imunocoloração avaliada somente em áreas em que o epitélio transicional pôde ser identificado.

Nossa série está de acordo com outros estudos que demonstraram alta expressão do GRPR em carcinomas epidermóides originados em outras

localizações anatômicas.^{23,31} Cerca de 54% de nossos espécimes de câncer mostraram altos níveis de forte expressão do GRPR quando comparada com apenas 12% dos espécimes controles. Esses resultados sugerem que GRPR possa estar envolvido no processo de carcinogênese anal. Apesar do tamanho de amostra limitado, nossos achados também sugerem que pacientes com carcinoma epidermóide de canal anal podem ser candidatos em potencial para inclusão em estudos clínicos futuros com antagonistas GRPR. O RC-3095 é um exemplo de antagonista GRPR sintético que exibe um perfil de toxicidade favorável e uma importante atividade antitumoral em modelos pré-clínicos. Em nossa instituição, um ensaio clínico fase I com RC-3095 foi conduzido em pacientes com neoplasias avançadas, confirmando perfil de toxicidade favorável.³²

Até o momento, não está claro se a expressão do GRPR no câncer anal pode influenciar no desfecho de resposta ao tratamento. Apesar de sua incidência relativamente baixa, o carcinoma de canal anal é uma doença agressiva quando não responsiva à terapia inicial, apresentando alta morbimortalidade. Nossos achados sugerem que análogos GRP e antagonistas GRPR possam ser considerados como alvos terapêuticos potenciais em ensaios clínicos futuros avaliando pacientes com este tipo de neoplasia. Devemos ressaltar, no entanto, que nossos dados necessitam ser confirmados em estudos adicionais envolvendo número maior de pacientes.

REFERÊNCIAS DO ARTIGO ORIGINAL

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:10–29.
2. Jemal A. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press; 2000.pp.144-155.
3. Webb SP, Lee CS. Epidermoid Cancer of the Anal Canal .*Clin Colon Rectal Surg.* 2011 Sep; 24(3):142-8.
4. Oliveira S, Teixeira L, Hoff PM, et al. Squamous-cell carcinoma of the anal canal: room for improvement with targeted therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012 Jun; 36(3):209-213.
5. Blumetti J, Bastawrous AL. Epidermoid cancers of the anal canal: current treatment. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009 May; 22(2):77-83.
6. Contu SS, Agnes G, Damin AP, et al. Lack of correlation between p53 codon 72 polymorphism and anal cancer risk. *World J Gastroenterol.* 2009 Sep 28; 15(36):4566-70.
7. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV negative homosexual and bisexual men. *AIDS* 1998; 12:495-503
8. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 1997; 337: 1350-1358
9. Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, et al. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer* 2009; 124: 2375-2383
10. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-632

11. Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, et al. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology*. 2007; 73(5-6):340-5
12. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug; 1766(1):23-41.
13. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007; 18: 1457–1466.
14. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jul 29; 114(2):541-8
15. Bajo AM, Schally AV, Groot K, et al. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 2004; 90(1):245-252
16. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, et al. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(20):10913-10918.
17. Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 1999; 155(6):2067-2076.
18. Sun B, Schally AV, Halmos G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regulatory Peptides*. 90(1-3):77-84, 2000.
19. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985; 316:823-826
20. Chave HS, Gough AC, Palmer K, Preston SR, Primrose JN. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *British Journal of Cancer*. 2000, 82(1):124-30

21. Tell R, Rivera CA, Eskra J, et al. Gastrin-releasing peptide signaling alters colon cancer invasiveness via heterochromatin protein 1Hs β . *Am J Pathol*. 2011 Feb; 178(2):672-8
22. Saurin JC, Roualt JP, Abello J et al. High gastrin – releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35 (1): 125-132.
23. Fang MZ, Liu C, Song Y, et al. Over-expression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 25(6):865-71, 2004.
24. Scott N, Millward E, Cartwright EJ, et al. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. *J Clin Pathol*. 2004 Feb; 57(2):189-92.
25. Nigro ND, Vaitkevicius VK, Considine B Jr. Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report. *Dis Colon Rectum*. 1974 May-Jun;17(3):354-6
26. Lampejo T, Kavanagh D, Clark J, et al. Prognostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the anus: a systematic review. *Br J Cancer*. 2010 Dec 7; 103(12):1858-27.
27. Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 159.
28. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, et al Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008 Feb; 15(1):58-64.
29. Flores DG, Meurer L, Uberti AF, et al: Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Res Bull* 2010; 82: 95–98.
30. Li X, Lv Y, Yuan A, Li Z. Gastrin-releasing peptide links stressor to cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:483-91.
31. Lango MN, Dyer KF, Lui VW, et al. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst* 2002; 9: 375–83.

32. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006; 24(5):403-412.