

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DA GASTRINA EM CÂNCER
HEPATOCELULAR**

Nícolas Silva Lazaretti

Orientador: Dr. Gilberto Schwartzmann

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2010.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DA GASTRINA EM CÂNCER
HEPATOCELULAR**

Nícolas Silva Lazaretti

Orientador: Dr. Gilberto Schwartzmann

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Gilberto Schwartzmann pelos ensinamentos, confiança e amizade.

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

A todos os funcionários do Serviço de Patologia do HCPA pela dedicação e paciência.

A minha equipe de pesquisa formada pelos acadêmicos Bruno Rocha Macedo e Patricia Izetti pelo tempo dispensado e esforços

À banca examinadora pela disposição de avaliar esse trabalho.

Aos meus pais, Rejane e Jorge, pelo exemplo de dignidade, trabalho e amor, pela confiança e estímulo durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Arthur e Fernando, pela hospitalidade e torcida constante.

A minha namorada Gisele, pelo amor, companheirismo e por me ajudar a concretizar este sonho.

Aos meus colegas oncologistas na cidade de Passo Fundo, Rodrigo Ughini Villarroel, Luis Alberto Schlittler e Moema Nenê Santos, pela dedicação dada aos meus pacientes nos momentos em que não pude estar presente para assisti-los.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP alfafetoproteína

ALT alanina aminotransferase

AST aspartato aminotransferase

BB3R receptor órfão da bombesina subtipo 3

BB4R receptor de bombesina subtipo 4

BLP peptídeo semelhante à bombesina

COX2 cicloxigenase 2

DNA ácido desoxirribonucléico

EGF fator de crescimento epidérmico

EGFR receptor do fator de crescimento epidérmico

FAK quinase de adesão focal

GRP peptídeo liberador da gastrina

GRPR receptor do peptídeo liberador da gastrina

GTPase enzima que hidrolisa guanosina trifosfato

HBV vírus da hepatite B

HCV vírus da hepatite C

HbsAg antígeno de superfície da hepatite B

HbeAg antígeno da hepatite B relacionado a replicação viral

HCC carcinoma hepatocelular

HH hemocromatose hereditária

HPV papilomavírus humano

IGF fator de crescimento insulínico

MAPK proteína quinase mitógeno-ativada

RNAm ácido ribonucléico mensageiro

Rt-PCR reação em cadeia da polimerase em tempo real

VGF fator de crescimento vascular

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Seqüências de bombesina e GRP.

Figura 2: Estrutura molecular do GRPR

Figura 3: Modelo de sinalização mediada por GRPR

Figura 4: Vias de sinalização ativadas pelo GRPR

Figura 5: Expressão global do GRPR no HCC, no tecido adjacente normal e cirrótico

Figura 6. Curvas de Kaplan-Meier para OS de pacientes com alta e baixa expressão do GRPR no HCC.

Figura 7. Sobrevida livre de doença em pacientes com expressão alta e baixa do GRPR sem evidências de doença após a cirurgia.

Tabela 1: Incidência de HCC em vários países e grupos étnicos

Tabela 2: Expressão de GRPR em tecidos neoplásicos humanos

Tabela 3. Descrição das amostras do estudo

Tabela 4. Correlação de diferentes achados clinico-patológicos com a expressão do GRPR no HCC.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA.....	14
Epidemiologia.....	14
Fatores de Risco.....	18
Pepíteo Liberador da Gastrina.....	26
OBJETIVOS.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ARTIGO.....	61
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	80
Seleção da Amostra.....	80
Resultados.....	80
PERSPECTIVAS.....	86
ANEXOS.....	87
Técnica de Imunohistoquímica.....	87
Quantificação dos Resultados.....	87

1 - RESUMO

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

O GRPR já foi identificado em diversas neoplasias humanas, mas até o presente momento não há nenhum dado na literatura quanto a sua expressão no carcinoma hepatocelular (HCC). Considerando que esta neoplasia é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, objetivamos avaliar, nesse estudo, o perfil de expressão de GRPR em lesões neoplásicas malignas do fígado.

Através da técnica de imunohistoquímica, lesões hepatocelulares malignas de 61 pacientes foram selecionadas do arquivo de patologia do HCPA, entre o período de janeiro de 2004 a março de 2009 e avaliados quanto à expressão de GRPR. O receptor foi detectado em 77% das amostras tumorais, na maioria das vezes exibindo padrão de coloração difuso; moderado ou forte (57.4%). Os GRPRs foram, também, intensamente expressos em lesões hepatocelulares cirróticas adjacentes às malignas (48.4%), entretanto, no tecido hepático normal (não-neoplásico e não-cirrótico) os GRPRs foram fracos e moderadamente expressos (36 a 59% respectivamente).

A expressão do GRPR mostrou-se significativamente associada com o estágio do tumor ($p= 0.047$), mas não houve relação com os parâmetros clínico-patológicos (idade, gênero, presença de infecção viral, de cirrose, tamanho do tumor e nível de AFP). Entretanto, a estratificação dos pacientes, baseada na expressão do GRPR, revelou que os pacientes, que tiveram uma alta expressão do GRPR, tenderam a apresentar a sobrevida global e a sobrevida livre de doença menor ($p= 0.174$).

Esse estudo demonstrou, pela primeira vez, a expressão aberrante de GRPRs no HCC em seres humanos.

ABSTRACT

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

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

Sections of paraffin-embedded hepatocellular carcinomas and cirrhotic surrounding tissues from 61 patients with primary HCC were studied, as well as 22 samples from non-cirrhotic and non-neoplastic hepatic tissue. GRPR immun-expression was demonstrated in the parenchymal tumor cells in 77% of tumor tissue samples (47/61) and was moderately to strongly expressed in 57.4% of these cases. In the surrounding cirrhotic liver, GRP immunostaining was also observed, showing a high expression in 15/31 of cases (48.4%). In the normal hepatic tissue, GRPR was also expressed, mostly with a weak to moderate expression (36.4 and 59.1, respectively). GRPR expression was significantly associated with tumor stage ($P=0.047$), but no correlation was observed with other clinicopathologic parameters (age, gender, virus,

liver cirrhosis, tumor size, and AFP level). Moreover, stratification of patients based on tumor GRPR expression revealed that the patients who had a high expression of GRPR tended to have a shorter overall survival (OS) time and a significantly shorter disease-free survival (DFS) time.

2 - INTRODUÇÃO

Em nosso laboratório, nós temos analisado várias biópsias obtidas de pacientes com carcinoma cervical e a alta expressão do receptor do GRP foi evidenciada [1]. Também, usando modelos de gliomas em ratos vivos, nos demonstramos uma grande diminuição do volume tumoral com o uso de temozolamida e o RC-3095 [2].

Considerando o seu mecanismo de ação inovador, tão bem como a ausência de toxicidade que possa limitar o uso de altas doses do RC-3095 em estudos animais, nós decidimos realizar um estudo fase I com esse agente em pacientes com neoplasias malignas avançadas e refratárias aos quimioterápicos convencionais. Um método analítico para a medida do nível plasmático do RC-3095 também tem sido desenvolvido pelo nosso grupo [3]. Interessantemente, os nossos dados confirmam a segurança e o efeito anti-tumoral do RC-3095 em uma série de 25 pacientes [4].

O presente estudo é parte do nosso esforço em identificar alguns tipos de tumores que possam ser alocados para a realização de uma intervenção terapêutica experimental em um estudo fase II. Para essa proposta, nosso empenho consiste em avaliar um grande número de tecidos encontrados em blocos de parafina que são obtidos de pacientes com diferentes tipos de câncer em nossa instituição.

O HCC é o quinto tipo de neoplasia maligna mais comum no mundo e a forma mais comum de câncer no fígado. O HCC é um tipo de tumor altamente resistente aos tratamentos quimioterápicos disponíveis, mesmo que sejam administrados em combinações [5] e a média de sobrevida, após o diagnóstico, varia de 6 a 20 meses [6,7,8].

A literatura disponível para a expressão dos receptores do GRP no HCC é escassa. Alguns estudos experimentais indicam que a bombesina está presente em tumores hepatocelulares em ratos [9]. No presente estudo, nos descrevemos a expressão do receptor BN/GRP em uma série de blocos de parafina obtidos de pacientes com HCC, tratados em nossa instituição. Também, nos investigamos se a expressão do GRPR pode ser um bom marcador prognóstico para essa doença.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia

O HCC resulta em aproximadamente 250.000 a 1 milhão de mortes em todo o mundo a cada ano [10,11,12,13]. O HCC tem uma distribuição por sexo, idade e posição geográfica única que, provavelmente, é determinado por fatores etiológicos específicos.

O câncer de fígado é a quinta causa de morte por câncer no mundo, a sua prevalência é consideravelmente maior nos homens. O número de mortes por ano causadas pelo HCC é praticamente idêntico ao da incidência em todo o mundo, destacando a sua alta taxa de letalidade [14].

A incidência do HCC varia muito segundo a localização geográfica (tabela 1). A sua distribuição pelo mundo também difere entre os grupos étnicos e as regiões de um mesmo país [10]. Essas diferenças extremas são provavelmente devido às variações regionais na exposição ao vírus da hepatite e a agentes ambientais. Como exemplo, a sua freqüência é relativamente alta em regiões com uma alta incidência de portadores do vírus da hepatite C e pequena nas regiões onde a incidência dessa virose é baixa.

Tabela 1 – Incidência de HCC em vários países e grupos étnicos (por 100.000 por ano)

País	Homens	Mulheres
Moçambique	112.9	30.8
Zimbawe	64.6	25.4
Gambia	33.1	12.6
Senegal	25.6	9.0
Africa do Sul		
Negros	26.3	8.4

Pardos	1.5	0.7
Caucasianos	1.2	0.6
Algeria	1.6	1.4
Nigeria	15.4	3.2
Argentina	9.9	5.8
Brasil	3.5	3.7
Peru	4.0	2.9
Jamaica	6.1	2.1
Estados Unidos		
Chineses	19.1	3.6
Negros	3.9	1.8
Japoneses	3.0	0.4
Caucasianos	2.9	1.1
Canada		
Eskimos	6.9	3.7
Alberta	1.3	0.5
Suica	10.2	1.5
Italia	8.6	3.3
Espanha	7.2	5.5
Franca	3.7	1.0
Alemanha	4.5	1.7
Dinamarca	3.6	2.3
Yugoslavia	2.9	1.2
Czechoslovakia	5.1	2.8
Reino Unido	1.6	0.8
Irlanda	0.1	0.3
China	34.4	11.6
Singapura		
Chineses	31.6	7.2
Malaio	15.6	5.3
Indianos	14.1	2.8
Korea	13.8	3.2
Japao		
Miyagi	11.2	4.0

Nagasaki	25.8	7.9
India	4.9	2.5
Philippinas	19.9	6.2
Hong Kong	32.3	7.4
Pakistão	0.7	0.8
New Zealand		
Maori	11.2	4.2
Non-Maori	2.4	1.1
Polinesia		
Islandia	26.6	2.3
Australia	2.0	0.7
Havai	7.8	2.4

- Regiões de alta incidência (mais de 15 casos por 100.000 habitantes por ano) incluem a África subsaariana, a República Popular da China, Hong Kong e de Taiwan [10]. A incidência é 24.2/100.000 em partes da África e os 35.5/100.000 na Ásia Oriental [15]. Mais de 40% dos casos ocorrem na República Popular da China, que tem uma incidência anual de 137.000 casos [16]. O Japão tem uma das maiores taxas de incidência do HCC associado com a infecção crônica pelo HCV, entretanto essa incidência parece estar diminuindo nos últimos anos [17].

- Áreas de incidência intermediária incluem vários países da Europa oriental e ocidental, Tailândia, Indonésia, Jamaica, Haiti, Nova Zelândia e do Alasca (esquimós) [10].

- América do Norte, do Sul, a maior parte da Europa, Austrália e partes do Oriente Médio são áreas de baixa incidência, com menos de três casos relatados por 100.000 habitantes por ano. No entanto, a incidência nos Estados Unidos aumentou durante as duas últimas décadas, possivelmente devido a um grande grupo de pessoas

com hepatite C crônica [18,19]. A taxa começou a acelerar em meados de 1980, provavelmente devido ao aumento da prevalência de HCV e da doença hepática não-alcoólica, embora HBV também possa contribuir [20].

Excluindo colangiocarcinoma intra-hepático, existem cerca de 8.500 novos casos de HCC a cada ano nos Estados Unidos [20]. Em um estudo publicado em 2009 (mas com base em dados de 1999), os custos médicos com essa doença foram orçados em cerca de 455 milhões dólares nos Estados Unidos [21].

A incidência do HCC nos Estados Unidos deve continuar a subir como consequência dos altos índices de infecção por hepatite C entre 1960 e 1990 e do tempo de latência média de 20 a 30 anos entre a aquisição do vírus e ao desenvolvimento de cirrose e carcinoma. Surpreendentemente, a variação percentual média de incidência (que tinha sido de 4,6 por cento por ano entre 1984 e 1999) foi de 2,4 por cento negativos por ano entre 1999 e 2002, segundo dados do SEER [19,22]. Não está claro se essa observação é um achado ocasional ou se reflete a uma verdadeira diminuição na sua incidência.

3.1.1 Distribuição por sexo e idade

Os homens estão mais propensos a desenvolver HCC. A disparidade é mais acentuada nas regiões de alta incidência, onde os homens são afetados 2,1-5,7 vezes mais frequentemente do que mulheres (média de 3.7:1). A proporção cai para uma média de 2,4:1 em áreas de incidência intermédia, e é menor nas regiões de baixa incidência. Apesar de não ser totalmente compreendida, a distribuição dessas diferenças, pelo sexo, é provavelmente devida às variações nas taxas de portadores de hepatite, a exposição a toxinas ambientais e ao efeito trófico dos andrógenos [13].

A maioria dos casos de HCC ocorre em pacientes com doença hepática crônica ou cirrose. Assim, os pacientes idosos, com doença hepática de longa data, são mais propensos a desenvolver esse tipo de câncer. Diversos grandes estudos prospectivos, realizados na Ásia e Europa Ocidental, têm observado uma média de idade no diagnóstico, dessa doença, entre 50 e 60 anos [23,24,25]. Na África subsaariana, no entanto, a média de idade de apresentação está diminuindo, com uma média de idade de 33 anos no diagnóstico [26].

3.1.2 Variações raciais e étnicas

Um estudo de base populacional nos Estados Unidos identificou variações raciais e étnicas na incidência do HCC [27]. A incidência foi maior entre os asiáticos que foi quase o dobro dos hispânicos brancos (11 versus 6,8 por 100.000 habitantes / ano) e quatro vezes maior do que nos caucasianos (2,6 por 100.000 habitantes / ano). As razões para essas diferenças estão, provavelmente, relacionadas com a causa subjacente da doença hepática, fatores genéticos e ambientais.

3.2 Fatores de Risco

Uma variedade de fatores de risco, importantes para o desenvolvimento do HCC, foram identificados. Estes incluem o estado de portador da hepatite B crônica, hepatite C, hemocromatose hereditária e cirrose provocada por qualquer causa. No entanto, o HCC pode, também, ocorrer em pacientes sem fatores de risco conhecidos [28].

3.2.1 Hepatite B

A associação entre o estado de portador de hepatite B e o HCC tem sido demonstrada em vários estudos de base populacional e em outros relatos [23,25,29,30,31]. Em um estudo, por exemplo, 22.707 funcionários públicos do sexo masculino, em Taiwan, 15 por cento dos quais eram portadores do VHB, foram seguidos entre 1975 e 1978 [23]. O risco relativo do HCC, nesses portadores do vírus da hepatite B, foi 223 vezes maior do que os não portadores desse vírus. Em outra série, o risco relativo foi de 6,9 entre 917 pacientes japoneses com cirrose ou hepatite crônica [25]. Uma relação semelhante foi demonstrada em um estudo prospectivo de portadores do VHB na América do Norte, 71 por cento dos quais eram da Ásia [30].

O risco de em portadores assintomáticos do VHB pode ser menor em países asiáticos. Em uma série com 317 pacientes portadores do HBV no Canadá, a maioria dos quais eram franco-canadenses, não houveram casos de HCC em 16 anos de acompanhamento [31]. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado na Áustria: apenas um caso de carcinoma hepatocelular ocorreu em 242 portadores assintomáticos de HBsAg em um seguimento de 3,5 anos [32]. Apenas 5 por cento destes indivíduos tinham hepatite crônica ou cirrose. A presença do VHB pode, também, estar envolvida na patogênese do HCC em pacientes HBsAg-negativos. Em um estudo foram utilizadas técnicas moleculares para avaliar 91 pacientes americanos com HCC que eram HBsAg negativos e que não tiveram nenhum outro fator de risco [33]. Marcadores para o VHB e / ou infecção pelo HCV estavam presentes em 65 pacientes com a seguinte distribuição: 13 por cento estavam infectados com o VHB sozinho, 43 por cento com a hepatite C, apenas, e 15 por cento com ambos HBV e HCV.

O risco de HCC é muito maior em pacientes HBeAg positivos, em comparação com aqueles que são HBsAg positivo, mas HBeAg negativo [34,35,36,37,38]. Um dos maiores estudos prospectivos para resolver este problema incluiu 11.893 homens de Taiwan, que foram testados para HBsAg e HBeAg e, posteriormente, seguidos por cerca de 10 anos durante os quais 111 casos de HCC foram detectados [39]. Em comparação com os homens que foram negativos para HBsAg e HBeAg, o risco relativo do foi de 9,6 (95% CI 6,0-15,2), para aqueles que foram positivos para HBsAg sozinho, e de 60,2 (95% CI 35.5-102.1) em comparação para aqueles que foram positivo para ambos os HBsAg e HBeAg.

O risco de HCC também parece estar relacionado com os níveis séricos de HBV DNA. Um dos maiores estudos para demonstrar essa relação incluiu 3.653 pacientes HBsAg positivo que foram acompanhados por uma média de 11,4 anos durante os quais houve 164 casos de HCC e 346 mortes [40]. A incidência foi diretamente relacionada ao nível de HBV DNA no soro; as taxas de incidência cumulativa foram de 1,3 e 14,9 por cento para os níveis de DNA-VHB de menos de 300 cópias/mL e 1 milhão de cópias/mL, respectivamente. Vários fatores de risco adicionais, para o desenvolvimento de HCC, em pacientes infectados com HBV, têm sido descritos. Um modelo preditivo identificou a idade avançada (em particular, com idade de 60 a 65 anos) e os níveis de HBV DNA de ≥ 10 (5) cópias/mL como os mais fortes fatores preditores independentes [41]. O mesmo estudo identificou a presença de cirrose hepática estabelecida como um curto (≤ 5 anos) preditor de HCC, enquanto que níveis elevados de ALT sérica, soro positividade para o HBeAg, o consumo de álcool habitual, e níveis elevados de HBV DNA conferem um risco aumentado ao longo do tempo [42]. Outros descobriram que a mutação precoce no HBV foi associada com o

desenvolvimento do HCC [43,44]. Co-infecção com a hepatite C também parece aumentar o risco.

Vários estudos têm avaliado o impacto do tratamento da hepatite B crônica sobre o risco de HCC. Uma meta-análise constatou que o tratamento com interferon ou análogos de nucleosídeos estavam associados a uma redução significativa no risco de adquirir essa neoplasia [45].

3.2.2 Toxinas ambientais

Pelo menos duas toxinas ambientais, a aflatoxina e a água potável contaminada podem contribuir para a patogênese do HCC. No entanto, sua contribuição para a carga da doença em todo o mundo (em comparação com outros fatores de risco tais como a infecção pelo HBV) é mínima. Além disso, eles provavelmente não são importantes fatores etiológicos independentes, mas podem contribuir para o desenvolvimento do HCC em indivíduos com outros fatores de risco.

A aflatoxina é uma micotoxina que normalmente contamina o milho, soja e o amendoim. Altas taxas de ingestão de aflatoxinas na dieta têm sido associadas ao HCC. Como exemplo, em Taiwan há uma incidência muito elevada de HCC, que não é totalmente explicada pelo estado de portador do VHB [46,47,48].

Mutações do gene supressor de tumor p53 têm sido demonstradas em pacientes com HCC que cronicamente são expostos à aflatoxina [49,50]. Achados semelhantes também foram demonstrados em modelos animais de hepatocarcinogênese, em que as mutações do gene p53 foram observadas em animais de laboratório expostos ao HBV e aflatoxinas [51]. O efeito de potencialização destes fatores de risco também foi demonstrado em ratos que expressavam o antígeno de superfície da hepatite B [52].

Vários estudos realizados em áreas rurais da China têm notado uma maior taxa de mortalidade pelo HCC entre as pessoas que bebem água da lagoa, em comparação com aqueles que bebem água de poço (100 contra menos de 20 mortes por 100.000 habitantes por ano) [53]. Algumas algas geralmente contaminam as lagoas e isso está sendo relacionado a uma forte associação com o surgimento desse carcinoma [54].

3.2.3 Hepatite C

Uma forte associação entre a infecção crônica de HCV e HCC foi observada quase imediatamente após a detecção de anticorpos contra a hepatite C, mas os mecanismos envolvidos na carcinogênese permanecem obscuros [55,56]. Até um terço dos casos de HCC estão sendo relacionados à infecção crônica pelo HCV nos Estados Unidos [19]. Uma observação importante é que os casos de HCC, em pessoas com hepatite C, ocorrem, quase exclusivamente, em pacientes com estágios avançados de fibrose hepática ou cirrose [57]. Em contrapartida, HCC pode ocorrer, sem cirrose ou fibrose significativa, em pacientes com hepatite crônica B.

Acredita-se, geralmente, que o HCC surge da replicação celular rápida e o estado inflamatório crônico induzido pelo vírus da hepatite C. Uma teoria é que há um desequilíbrio no microambiente e a superprodução de citocinas no fígado de pacientes infectados com o vírus da hepatite C, levando à inflamação e aumento da renovação celular, que finalmente ocasiona a cirrose. Pouco provavelmente, hepatócitos diferenciados proliferam e se desenvolvem em nódulos displásicos e, conseqüentemente, o HCC [58]. Um apoio a essa hipótese é a observação de que o HCV e o HCC correlacionam-se bem com o grau de inflamação e necrose, que parecem ser causados pela inflamação, em vez da ativação de oncogenes específicos

[59,60]. Em contraste, a hepatite B relacionada com HCC, não se correlaciona bem com a inflamação, e parece haver oncogenes específicos que são induzidos pelo vírus que, portanto, resultam em um aumento do risco dessa neoplasia.

O grau de inflamação no fígado de pacientes com hepatite C também se correlaciona com o prognóstico, uma vez HCC é diagnosticado. Vários estresses oxidativos e marcadores de inflamação foram examinados no tecido não canceroso do fígado em pacientes que tiveram ambos HCV e carcinoma hepatocelular. Os pacientes com níveis mais elevados desses marcadores tinham um pior prognóstico [61]. A resposta imune do hospedeiro também pode ser um importante fator associado com um risco de progressão para cirrose e câncer [62].

3.2.4 Hepatite crônica e cirrose hepática

Pacientes com doença hepática crônica (hepatite crônica ou cirrose) de qualquer causa têm um risco aumentado de desenvolvimento de adquirir o HCC [63,64]. Isto tem implicações importantes principalmente para a ressecção cirúrgica e, também, para outras formas de tratamento do HCC.

Cirróticos compensados têm uma incidência de 3-4 por cento anual de HCC, e aqueles com hepatite crônica têm um risco anual aproximado de 1 por cento. Os doentes com hepatite crônica e níveis séricos elevados alfa-fetoproteína têm um maior risco de adquirir esse câncer do que aqueles com valores normais (<20 mcg / L) [64].

Pacientes com hepatite crônica ou cirrose que têm hepatite B, hepatite C, ou hemocromatose hereditária (HH) têm o maior risco de desenvolvimento de HCC. Entre os pacientes com HH, HCC é praticamente limitado a pacientes com cirrose [65,66,67].

O risco foi aumentado significativamente em doentes com mais de 55 anos e aqueles com HBsAg positivos e abuso de álcool.

Uma relação semelhante à cirrose tem sido relatada em pacientes com cirrose biliar primária. Um estudo de coorte avaliou de 667 pacientes com cirrose biliar primária, durante um período de 20 anos [68]. O HCC não foi visto em qualquer um dos 394 pacientes que tiveram a doença estágio I ou II em sua última biópsia hepática. Em contraste, HCC foi desenvolvido em 16 dos 273 pacientes (5,9 por cento) com estágio III ou IV da doença, entre estes pacientes. Essa doença foi muito mais comum nos homens do que nas mulheres (20 contra 4 por cento).

3.2.5 Tabaco e álcool

O consumo de cigarros tem demonstrado ser um fator de risco para HCC em alguns [69,70], mas não em todos os estudos [71,72,73]. O consumo de álcool tem sido associado em muitos estudos [71-76], embora o limite da dose e duração do uso não seja claro. A relação entre o etanol e o HCC pode ser devida há um efeito tóxico direto ou um indireto, uma vez que o álcool representa um importante fator de risco para a cirrose [25]. O risco de HCCr induzida pelo álcool pode ser modificado pela presença de hepatite viral [74,77,78]. Como exemplo, em um estudo caso-controle italiano, que incluiu 464 pacientes com HCC e 824 controles, houve um aumento linear no risco relativo para o surgimento de HCC com a ingestão de álcool superior a 60 gramas por dia [74].

3.2.6 Doença hepática gordurosa não-alcoólica e diabetes mellitus

Estudos epidemiológicos sugerem uma possível ligação entre diabetes mellitus e HCC [79,80,81]. Uma revisão sistemática que incluiu um total de 26 estudos estimou que o risco foi aumentado em cerca de 2,5 vezes (razão de risco 2,5, IC 95% 1,8-3,5), embora poucos estudos foram ajustados para a dieta e obesidade [82]. Além disso, há evidências crescentes de que a doença hepática gordurosa não-alcoólica representa uma doença hepática subjacente cada vez mais freqüente em pacientes com HCC [22]. É provável que a doença hepática gordurosa não-alcoólica cause HCC via cirrose, embora a patogênese exata ainda, dessa doença, não foi determinada.

3.2.7 Polimorfismos de fator de crescimento epidérmico

Certos polimorfismos do gene do fator de crescimento epidérmico têm sido associados com um risco aumentado de HCC em pacientes com cirrose [83]. A superexpressão do fator de crescimento epidérmico no fígado tem sido associada com HCC em modelos animais, fornecendo uma justificativa para a associação observada.

3.3 Peptídeo Liberador da Gastrina (GRP)

3.3.1 Descoberta do GRP

O tetradecapeptídeo bombesina foi primeiramente isolado e caracterizado a partir da pele do anfíbio *Bombina bombina* [84]. Posteriormente, peptídeos semelhantes à bombesina (BLPs) foram identificados em mamíferos, sendo os maiores níveis observados em células pulmonares neuroendócrinas [85]. O principal BLP foi chamado de peptídeo liberador da gastrina devido a sua primeira atividade conhecida de indução da secreção de gastrina a partir das células G do antro gástrico. O GRP possui 27 aminoácidos e compartilha com a bombesina uma sequência altamente conservada de 7 aminoácidos C-terminal, o que é essencial para a imunogenicidade e para uma ligação de alta afinidade ao receptor preferencial do GRP [86] (Figura 1). Assim, GRP e bombesina apresentam essencialmente efeitos fisiológicos idênticos.

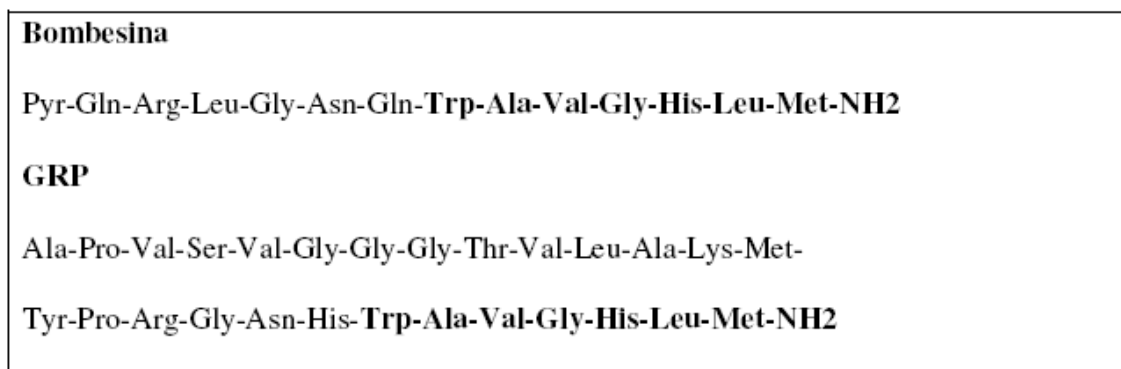


Figura 1: Sequências de bombesina e GRP. As porções C-terminais de bombesina e GRP, em negrito, são idênticas.

3.3.2 Receptor preferencial do GRP, GRPR

Os receptores de GRP pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína G, considerada a maior família de moléculas de superfície celular envolvida na transmissão de sinais e que contribui com mais de 2% dos genes codificados pelo genoma humano [87,88]. Uma característica central deste grupo é a estrutura comum de sete domínios alfa-hélices transmembrana, sendo que a ligação à proteína G se dá através do domínio intracelular (Figura 2). De uma maneira geral, a natureza da cascata de sinalização gerada depende da especificidade de ligação de cada receptor à proteína G.

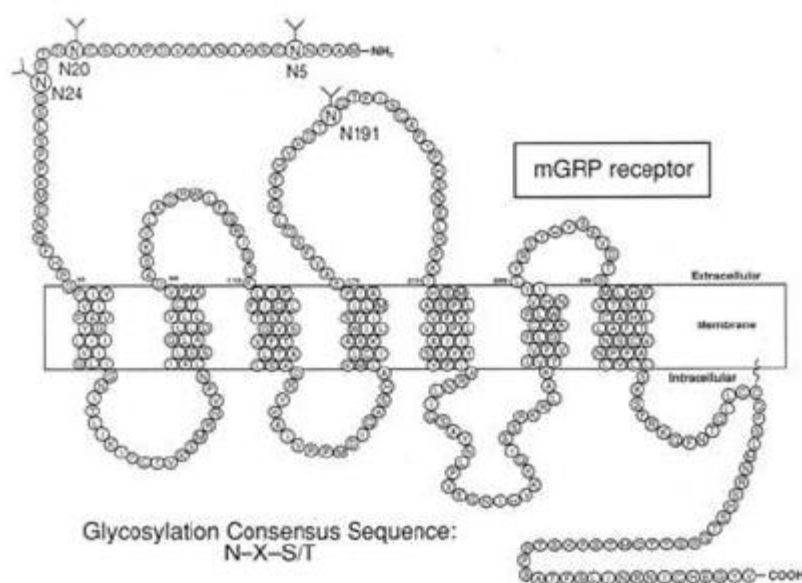


Figura 2: Estrutura molecular do GRPR [95].

Até o presente momento já foram descritos quatro subtipos de receptores para a família dos BLPs; o receptor preferencial do GRP, GRPR [89,90], receptor de neuromedina B, NMBR [91], receptor órfão da bombesina subtipo 3, BB3R [92] e receptor de bombesina subtipo 4, BB4R [93], este último limitado aos anfíbios. Estes receptores podem ser distinguidos com base na sua afinidade pelos agonistas e

antagonistas. O GRPR possui alta afinidade por bombesina e GRP, enquanto que praticamente não se liga à neuromedina B, outro conhecido membro dos BLPs [94].

Quando um agonista se liga ao GRPR, ocorre ativação da fosfolipase C e aumento das concentrações de inositol trifosfato, diacilglicerol e cálcio [95]. A liberação de cálcio se dá, inicialmente, por uma liberação dos estoques intracelulares e é posteriormente sustentada pelo influxo deste cátion através da membrana celular (Figura 3).

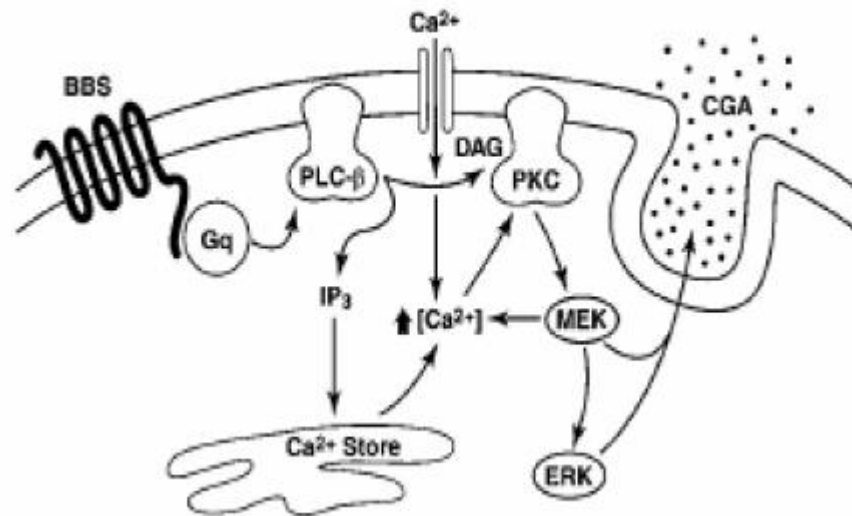


Figura 3: modelo de sinalização mediada por GRPR [102].

Entre as vias de sinalização celular ativadas pelos GRPRs já foram caracterizadas a da proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), proteína quinase C (PKC) e quinase de adesão focal (FAK) [96]. Além de promover crescimento e proliferação, estes receptores também estão envolvidos na migração celular e angiogênese. Eles estimulam a pequena GTPase Rho, que tem um papel central na migração celular através do estímulo da ROCK [97] e ativam a fosfolipase A2 (PLA2) e

cicloxigenase 2 (COX2), aumentando a produção de prostaglandina E2 (PGE2) [98] (Figura 4).

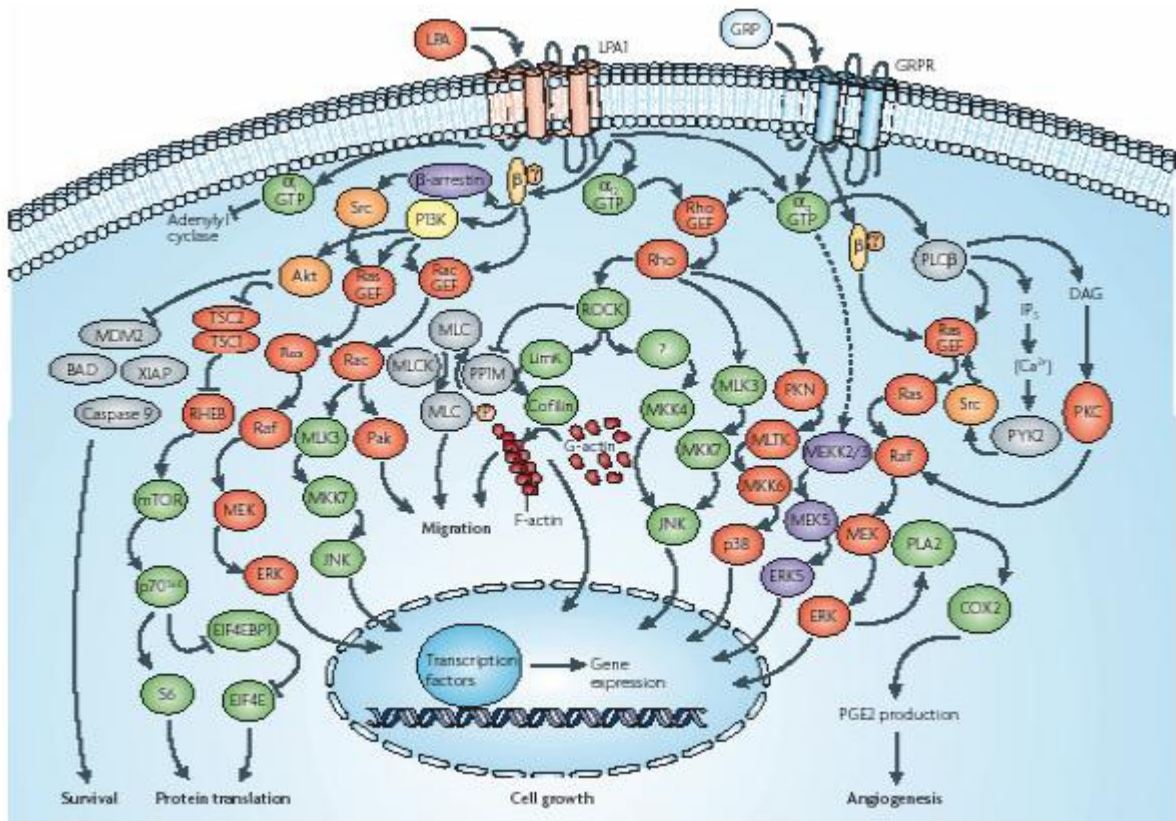


Figura 4: Vias de sinalização ativadas pelo GRPR [94].

3.3.3 Funções do GRP

O GRP desempenha diversos papéis fisiológicos, além do estímulo à secreção ácida gástrica. São responsáveis por promover a liberação de vários hormônios no trato gastrointestinal, incluindo gastrina, somatostatina e colecistoquinina, e de estimular a secreção de enzimas pancreáticas. Além disso, participam da contração da musculatura lisa em diversos tecidos e atuam como neurotransmissores no sistema nervoso central [99].

Entre os efeitos neurológicos dos GRP já foram descritas alterações comportamentais, anorexia e melhora da consolidação da memória em modelos animais [100]. Estes peptídeos podem estar envolvidos na patogênese de diversas desordens do sistema nervoso central, como a doença de Parkinson, a esquizofrenia e a doença de Alzheimer [101].

O GRP modula, estimulando ou inibindo, a função de linfócitos [102], fagócitos [103] e mastócitos, estando implicado na patologia de doenças pulmonares [104] e artrite reumatóide [105]. O uso de um antagonista seletivo de GRPR em um modelo de sepsis provou aumentar a sobrevivência de roedores, demonstrando um efeito protetor aos danos teciduais e atenuando a liberação de citocinas inflamatórias [106]

Os GRPs parecem estar bem relacionados a processos inflamatórios e imunológicos [107,108,109].

3.3.4 GRP, GRPR e câncer

O GRP e a bombesina possuem efeitos mitogênicos já bem estabelecidos. Estes peptídeos estimulam o crescimento de tecidos normais, como pâncreas [110], mucosa gastrointestinal [111] e epitélio brônquico [112]. O primeiro estudo em neoplasias mostrou que o emprego de um anticorpo monoclonal dirigido ao GRP, impedindo a ligação ao seu receptor, inibiu o crescimento de câncer de pulmão de pequenas células *in vitro* e *in vivo* [113].

Desde então, muitos grupos de pesquisa passaram a investigar o papel do GRP no desenvolvimento e progressão do câncer. Através de estudos com linhagens celulares e modelos animais, o tratamento com bombesina/GRP promoveu proliferação em diversas neoplasias, incluindo próstata [114], cólon [115], estômago [116] e mama

[117]. A detecção simultânea de GRP e seu receptor nos tecidos, bem como os efeitos antiproliferativos dos anticorpos anti-GRP, levaram ao reconhecimento deste peptídeo como um fator de crescimento autócrino no câncer. Mais recentemente, demonstrou-se que o GRP também é capaz de estimular os receptores de forma parácrina [118].

A ampla expressão de receptores de fatores de crescimento na superfície das células malignas reconhecidamente confere maior agressividade biológica aos tumores. Além de promover proliferação celular, os fatores de crescimento estão envolvidos em processos de invasão local, metastatização, angiogênese e apoptose [119].

Estes parâmetros também vêm sendo investigados nos estudos com GRPRs. Analisando neoplasias de cólon, alguns autores relacionaram invasão linfática e perda de diferenciação celular à maior expressão de GRPRs [120].

Similarmente, outros pesquisadores foram capazes de associar níveis superiores de GRPRs a tumores de ovário mais indiferenciados [121], bem como a neuroblastomas mais agressivos [122]. Em tumores de mama metastáticos para linfonodos axilares houve 100% de expressão de GRPR nas metástases de tumores primariamente positivos para este receptor [123]. Em um estudo com carcinomas renais implantados em ratos, receptores GRP foram encontrados na micro-circulação tumoral, enquanto que a neo-angiogênese foi significativamente inibida com o emprego de um antagonista GRPR [124].

3.3.5 Análogos e Antagonistas de GRPR

A estratégia de tratamentos dirigidos a receptores de fatores de crescimento progrediu significativamente na última década. Os resultados obtidos na prática clínica com terapias-alvo, a exemplo das terapias anti-EGFR [125], vêm encorajando

pesquisadores a desenvolver compostos capazes de interagir com estes receptores, através de biomarcadores para detecção e estadiamento de neoplasias, ou de análogos e antagonistas para tratamento das mesmas. Muitos estudos têm explorado o GRPR como alvo diagnóstico e terapêutico. Na área de diagnóstico por imagem já foram desenvolvidos diversos conjugados com análogos de GRP. Um radionuclídeo bastante utilizado é o tecnécio, que em combinação com análogos de bombesina demonstrou alta afinidade por GRPRs [126], com elevada absorção por tumores gastro-entero-pancreáticos, mamários, pulmonares e prostáticos [127].

Em estudo fase I, realizado em pacientes com câncer de próstata, o uso de um conjugado de bombesina com tecnécio não provocou efeitos colaterais relevantes e os tumores foram bem visualizados já nos primeiros minutos de imagens tomográficas e planas. Com base nestes resultados, foi proposto que este radiofármaco poderia ser utilizado como marcador em cirurgias guiadas por radioisótopos [128]. Além do tecnécio, muitos outros radionuclídeos estão sendo combinados com análogos de GRP, como o gálio, índio, lutécio e rênio [129].

Outro composto que foi avaliado em estudo fase I é o conjugado de bombesina e ^{177}Lu -Amba, como método diagnóstico e radioterapia sistêmica, após excelente desempenho em estudos pré-clínicos [130].

Com finalidades terapêuticas, análogos de bombesina têm sido combinados a diversos agentes citotóxicos, atuando como veículos carreadores de drogas. Ainda em fase experimental, muitos compostos têm se mostrado eficientes na inibição do crescimento de diversos tumores *in vitro* e *in vivo* [131].

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

bloquear a cascata de sinalização celular que seria desencadeada pelo acoplamento do ligante. Na última década, foram desenvolvidos diversos antagonistas GRPR com capacidade de inibir o crescimento de tumores [132, 133, 134].

Um composto que tem demonstrado notável atividade antitumoral é o antagonista RC-3095, já testado em diversas neoplasias. Este agente já provou ser ativo contra câncer de mama [135, 136], pulmão [137], ovário [138], próstata [139], glioblastomas [140, 141], entre outros. Seu efeito parece interferir com importantes vias de sinalização como a do EGF e VEGF [142, 143, 144].

Em nosso centro, o RC-3095 está sendo avaliado em linhagens celulares de tumores e modelos animais, bem como em estudos clínicos em humanos. Recentemente foi realizado um estudo fase I com vinte e cinco pacientes portadores de neoplasias sólidas avançadas, em que este antagonista GRPR demonstrou perfil de toxicidade favorável, após aplicações subcutâneas diárias. Neste mesmo ensaio, uma única dose de RC-3095 administrada a um paciente hipergastrinêmico, portador da Síndrome de Zollinger-Ellison, produziu decréscimo superior a 50% nos níveis plasmáticos de gastrina [145].

3.3.6 Expressão de GRPR em Tumores

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

imunohistoquímica, ou rt-PCR, provando ser mais ampla no câncer em comparação aos tecidos normais [146]. A tabela 2 sumariza alguns tipos tumorais já estudados.

Em certos tumores, a taxa de expressão do GRPR chegou a ser 100%, incluindo próstata, cólon, rim, neuroblastoma, cabeça e pescoço [147-153] Entre as neoplasias ginecológicas, já foram detectados GRPRs em carcinomas de ovário, de corpo e colo de útero [1,121,138,154]. Em nosso centro a superexpressão do GRP tem sido pesquisada em diversas neoplasias malignas como câncer de cólon, pulmão, mama além do HCC.

Tabela 2 - Expressão de GRPR em tecidos neoplásicos humanos [153]

Type of cancer	No. cases	No. positive	%	Method	Reference
Prostate	12	12	100	PCR	[48]
	30	30	100	Binding	[49]
	80	50	63	Binding	[50]
	22	20	91	PCR	[50]
	12	12	100	Binding	[51]
Gastrinoma	5	5	100	Binding	[51]
Breast	100	33	33	Binding	[52]
	71	44	62	Binding	[53]
	57	41	72	Binding	[51]
Ovarian	22	17	77	PCR	[54]
Pancreatic	12	2	17	Binding	[56]
	26	2	8	PCR	[55]
	29	0	0	Binding	[57]
Colon	21	5	24	Binding	[58]
	29	27	93	PCR	[60]
	50	38	76	IH	[61]
	23	23	100	PCR	[59]
Renal	4	4	100	PCR	[62]
	16	6	35	Binding	[51]
	18	13	72	PCR	[63]
Lung (SCLC)	7	2	29	PCR	[64]
	9	3	33	Binding	[51]
Head and Neck	25	25	100	PCR	[65]
Neuroblastoma	33	24	73	IH	[66]
	19	19	100	PCR	[67]
Esophageal	12	10	83	PCR	[68]
GI carcinoid	26	22	85	IH	[69]
Gastric	23	12	50	Binding	[70]
	20	8	40	PCR	[71]
Uterine	29	11	38	Binding	[73]

4 – OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão do GRPR no HCC através da técnica imunoistoquímica.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, por imunoistoquímica, se existe diferença da expressão do GRPR entre pacientes com HCC e com diferentes fatores prognósticos como grau histológico, estadiamento tumoral (TNM), presença de cirrose, invasão vascular e os vírus da hepatite.
- Avaliar por imunohistoquímica se existe diferença da expressão do GRPR entre as lesões neoplásicas e tecidos hepatocelulares adjacentes não-neoplásicos (cirróticos e normais).

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORNELIO, DB. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Expression in Cervical Cancer. *Oncology* 73:340–345 (2008).
2. DE OLIVEIRA, MS. Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol.* 93(2):203. (2009)
3. PEREIRA, AS. Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Feb 25;816(1-2):321-6.
4. SCHWARTSMANN, G.; DI LEONE L.P.; HOROWITZ, M., et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest. New Drugs*, v. 24(5), p. 403-412, 2006.
5. LLOVET JM, (2003) Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects. *Journal of Hepatology*, 38:S136-149.
6. GIOVANNINI M, (2001) Hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 84:74–7.
7. MOFFAT DF (2000) Hepatocellular carcinoma after long-term tamoxifen therapy. *Ann Oncol* 11:1195–6.

8. POON RT, (2001) Clinicopathologic features of long-term survivors and disease-free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. *J Clin Oncol* 19:3037–44.
9. NILSSON H. Growth factor induced mitogenic effects and inositol phosphate responses in primary hepatocyte cultures from normal rat liver and rat liver nodules. *Carcinogenesis* 1994; 15:1821–1826.
10. MUNOZ, N. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: *Neoplasms of the Liver*, Okuda, K, Ishak, KG (Eds), Springer, Tokyo 1989. p.3.
11. MUIR, C.. Cancer incidence in five continents. Vol. 5 (IARC publications, No. 88). International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987.
12. BOSCH, FX. Hepatocellular carcinoma in the world: Epidemiologic questions. In: *Etiology, Pathology and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in America*. Advances in Applied Technology Series, Tabor, E, DiBisceglie, AM, Purcell, RH (Eds), Gulf, Houston 1991. p.35.
13. OKUDA, K. Epidemiology of primary liver cancer. In: *Primary Liver Cancer in Japan*, Tobe, T (Ed), Springer-Verlag, Tokyo 1992. p.3.
14. PARKIN, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533.

15. PARKIN, D.M, Cancer Incidence in five continents: IARC scientific publications volume VIII (No. 155), Lyon: IARC Press 2002.
16. SKOLNICK, AA. Armed with epidemiologic research, China launches programs to prevent liver cancer (news). JAMA 1996; 276:1458.
17. TANAKA, H. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. Ann Intern Med 2008; 148:820.
18. EI-SERAG, H.B. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. Ann Intern Med 2003; 139:817.
19. DAVILA, J.A, Morgan. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: A population-based study. Gastroenterology 2004; 127:1372.
20. EI-SERAG, H. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. Gastroenterology 2004; 127:S27.
21. LANG, K. The burden of illness associated with hepatocellular carcinoma in the United States. J Hepatol 2009; 50:89.

22. MARRERO, J.A. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002; 36:1349.
23. BEASLEY, R.P. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2:1129.
24. COLOMBO, M. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325:675.
25. TSUKUMA, H. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1797.
26. PRATES, M.D. A cancer survey in Lourenco Marques, Portuguese East Africa. *J Natl Cancer Inst* 1965; 35:729.
27. WONG, R. Racial and ethnic variations in hepatocellular carcinoma incidence within the United States. *Am J Med* 2008; 121:525.
28. BRALET, M.P. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: Epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 2000; 32:200.
29. YU, MW. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 17:71.

30. SHERMANN, M. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: Incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995; 22:432.
31. VILLENUEVE, J.P. A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal. *Gastroenterology* 1994; 106:1000.
32. DRAGOSICS, B. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: A clinical and histological evaluation of 242 cases. *Hepatology* 1987; 7:302.
33. LIANG, T.J. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 1993; 18:1326.
34. LU, S.N. A case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer* 1988; 62:2051.
35. CHEN, C.J. Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking, cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1991; 13:398.
36. LIN, T.M. Hepatitis B virus e antigen and primary hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 1991; 11:2063.

37. YU, M.W. Association between hepatitis C virus antibodies and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1991; 51:5621.
38. TSAI, J.F. Additive effect modification of hepatitis B surface antigen and e antigen on the development of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73:1498.
39. YANG, H.I. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347:168.
40. CHEN, C.J, Yang, HI, Su, J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295:65.
41. CHEN, C.J. Models to predict hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B infection: The REVEAL HBV study (abstract). *Hepatology* 2005; 42 Suppl 1:714A.
42. CHEN, C.J. Time-dependent relative risk of hepatocellular carcinoma for markers of chronic hepatitis B. The REVEAL HBV study (abstract). *Hepatology* 2005; 42 Suppl 1:722A.
43. TONG M.J. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int* 2007; 27:1356.

44. LIU, S. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1066.
45. SUNG, J.J. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:1067.
46. CHEN, C.J. Elevated aflatoxin and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24:38.
47. QIAN, G.S, A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3:3.
48. BOSCH, F.X. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19:271.
49. BRESSAC, B. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350:429.
50. UNSAL, HI. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:822.

51. YAN, R.Q. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122:289.
52. GHEBRANIOUS, N. Hepatitis B injury, male gender, aflatoxin, and p53 expression each contribute to hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1998; 27:383.
53. YU, S.Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10:674.
54. UENO, Y. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996; 17:1317.
55. BRUIX, J. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis [see comments]. *Lancet* 1989; 2:1004.
56. COLOMBO, M. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma [see comments]. *Lancet* 1989; 2:1006.
57. LOK, A.SI. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis c-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009; 136:138.

58. BUDHU, A. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1197.
59. MORIYA K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4:1065.
60. KAMEGAYA, Y. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005; 41:660.
61. MAKI, A. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1182.
62. SURUKI, R.Y. Host immune status and incidence of hepatocellular carcinoma among subjects infected with hepatitis C virus: a nested case-control study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:2521.
63. ZAMAN, S.N. Silent cirrhosis in patients with hepatocellular carcinoma: Implications for screening in high-incidence and low-incidence areas. *Cancer* 1990; 65:1607.
64. Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment. Liver Cancer Study Group of Japan. *Ann Surg* 1990; 211:277.

65. FARGION, S. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1994; 20:1426.
66. NIEDERAU, C. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 313:1256.
67. DEUGNIER, Y.M. Primary liver cancer in genetic hemochromatosis: A clinical, pathological, and pathogenetic study of 54 cases. *Gastroenterology* 1993; 104:228.
68. JONES, D.E. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis and its impact on outcomes. *Hepatology* 1997; 26:1138.
69. YU, MC. Nonviral risk factors for hepatocellular carcinoma in a low-risk population, the non-Asians of Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:1820.
70. KUPER, H. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 85:498.
71. MAYANS, M.V. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Catalonia, Spain. *Int J cancer* 1990; 46:378.

72. TANAKA, K. Hepatitis B virus, cigarette smoking and alcohol consumption in the development of. *Int J Cancer* 1992; 51:509.
73. MOHAMED, A.E,. Alcohol consumption as a risk factor for hepatocellular carcinoma in urban. *Int J Cancer* 1992; 51:537.
74. DONATO, F. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155:323.
75. LIEBER, C.S. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 1994; 106:1085.
76. CHIESA, R. Etiology of hepatocellular carcinoma in Italian patients with and without cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:213.
77. BRECHOT, C. Interactions between alcohol and hepatitis viruses in the liver. *Clin Lab Med* 1996; 16:273.
78. SCHIFF, E.R. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology* 1997; 26:39S.
79. EI-SERAG, H.B. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126:460.

80. JEE, S.H. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *Jama* 2005; 293:194.
81. INOUSE, M. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med* 2006; 166:1871.
82. EI-SERAG, HB. The Association Between Diabetes and Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review of Epidemiologic Evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:369.
83. TANABE, K.KI. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *JAMA* 2008; 299:53.
84. ANASTASI, A.; ERSPAMER, V. & BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombesina* and *Alytes*. *Experimentia* v. 27, p. 166-169, 1971.
85. JOHNSON, D.E.; LOCK, J.E. ; ELDE, R.P. & THOMPSON, T.R. Pulmonary neuroendocrine cells in hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Res.*, v. 16, p. 446-454, 1982.
86. SUNDAY, M.E.; KAPLAN, L.M.; MOTOYAMA, E., et al. Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab. Invest.*, v. 59, p. 5-24, 1988.

87. DORSAM, R.T. & GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer*, v. 7, p. 79-94, 2007.
88. BENYA, R.V. Glycosylation of the gastrin-releasing peptide receptor and its effect on expression, G protein coupling, and receptor modulatory processes. *Mol Pharmacol*. 2000 Dec;58(6):1490-501.
89. SPINDEL, E.R.; GILADI, E.; BREHM, P., et al. Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin releasing peptide receptor. *Mol. Endocrinol.*, v. 4, p. 1956-1963,1990.
90. BATTEY, J.F.; WAY, J.M.; CORJAY, M.H., et al. Molecular cloning of the bombesin/gastrin releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 395-399, 1991.
91. WADA, E.; WAY, J.; SHAPIRA, H., et al. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron.*, v. 6, p. 421-430, 1991.
92. FATHI, Z.; CORJAY, M.H.; SHAPIRA, H., et al. BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 5979-5984, 1993.

93. NAGALLA, S.R.; BARRY, K.C.; CRESWICK, P., et al. Cloning of a receptor for amphibian [Phe¹³]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 6205-6209, 1995.
94. GILADI, E.; NAGALLA, S.R.; SPINDEL, E.R. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. *J. Mol. Neurosci.*, v. 4, p. 41-54, 1993.
95. HELLMICH M.R., Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274 (34):23901-9.
96. APRIKIAN A.G., Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int J Cancer.* 1997 Jul 29;72(3):498-504.M
97. MARINISSEN, M.J. & GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 22, p. 368-376, 2001.
98. ROZENGURT, E.; GUHA, S. & SINNETT-SMITH, J. Gastrointestinal peptide signaling in health and disease. *Eur. J. Surg. Suppl.*, v. 587, p. 23-38, 2002.

99. BUNNETT, N. Gastrin releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ (editors): Gut Peptides: Biochemistry and Physiology. New York, Raven Press, p. 423-445, 1994.
100. ROESLER, R.; LUFT, T.; OLIVEIRA, S.H., et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 51(2), p. 350-357, 2006a.
101. ROESLER, R.; HENRIQUES, J.A. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing Peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, v. 5(2), p. 197-204, 2006b.
102. MEDINA, S.; DEL RIO, M.; DE LA CUADRA, B., et al. Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides*, v. 33, p. 173– 179, 1999.
103. DE LA FUENTE, M.; DEL RIO, M.; FERRANDEZ, M.D. & HERNANZ, A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology*, v. 73(2), p. 205-211, 1991.

104. SUBRAMANIAN, M.; SUGIYAMA, K.; COY, D.H., et al. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 168, p. 601–611, 2003.
105. GRIMSHOLM, O.; RANTAPAA-DAHLQVIST, S. & FORSGREN, S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, v. 7, p. R416–R426, 2005.
106. DALPIZZOL, F.; DI LEONE, L.P.; RITTER, C., et al. Gastrin-releasing Peptide Receptor Antagonist Effects on an Animal Model of Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 173(1), p. 84-90, 2006.
107. PEREIRA, D.V., Effects of an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor in an animal model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Nov;50(11):5300-3. Epub 2009 Jun 10.
108. PETRONILHO, F. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides.* 2009 Aug;30(8):1460-5. Epub 2009 Jun 6.
109. OLIVEIRA, P.G., Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides.* 2008 Oct;29(10):1726-31. Epub 2008 Jun 12.

110. PAREKH, D.; ISHIZUKA, J.; TOWNSEND, C.M. Jr., et al. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas*, v. 9, p. 83-90, 1994.
111. CHU, K.U.; EVERS, B.M.; ISHIZUKA, J., et al. Role of bombesin on gut mucosal growth. *Ann. Surg.*, v. 222, p. 94-100, 1995.
112. WILLEY, J.C.; LECHNER, J.F. & HARRIS, C.C. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, v. 153, p. 245-248, 1984.
113. CUTTITTA, F.; CARNEY, D.N.; MULSHINE, J., et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, v. 316, p. 823-826, 1985.
114. BOLOGNA, M.; FESTUTTIA, C.; MUZI, P., et al. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*, v. 63, p. 1714-1720, 1989.
115. NARAYAN, S.; GUO, Y.S.; TOWNSEND, C.M. Jr., et al. Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro. *Cancer Res.*, v. 50, p. 6772-6778, 1990.

116. KIM, H.J.; EVERS, B.M.; GUO, Y., et al. Bombesin-mediated AP-1 activation in a human gastric cancer (SIIA). *Surgery*, v. 120, p. 130-136, 1996.
117. BURNS, D.M.; WALKER, B.; GRAY, J.& NELSON, J. Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative responses to bombesin. *Br. J. Cancer* 1999; v. 79, p. 214-220, 1999.
118. HEASLEY, L.E. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*, v. 20, p. 1563-1569, 2001.
119. PERONA, R. Cell signaling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.*, v. 8(2), p. 77-82, 2006.
120. SAURIN, J.C. ; ROUALT, J.P. ; ABELLO, J., et al. High gastrin-releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *Eur. J. Cancer*, v. 35(1), p. 125-132, 1999.
121. SUN, B.; SCHALLY, A.V. & HALMOS, G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Reg. Pept.*, v. 90(1-3), p. 77-84, 2000. a
122. KIM, S.; HU, W.; KELLY, D.R., et al. Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Ann. Surg.*, v. 235(5), p. 621-629, 2002.

123. GUGGER, M. & REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am. J. Pathol.*, v. 155(6), p. 2067-2076, 1999.
124. HEUSER, M. ; SCHLOTT, T. ; SCHALLY, A.V., et al. Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J. Urol.*, v. 173, p. 2154-2159, 2005.
125. VOKES, E.E. & CHU, E. Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology*, v. 20(5 Sup.l 2), p. 15-25, 2006.
126. BAIDOO, K.E.; LIN, K.S.; ZHAN, Y., et al. Design, synthesis, and initial evaluation of high affinity technetium bombesin analogues. *Bioconj. Chem.*, v. 9, p. 218-225, 1998.
127. VARVARIGOU, A.; BOUZIOTIS, P.; ZIKOS, C., et al. Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother. Radiopharm.*, v. 19(2), p. 219-229, 2004.
128. DE VICENTIS, G.; SCOPINARO, F.; VARVARIGOU, A., et al. Phase I trial of technetium [Leu13] bombesin as cancer seeking agent: possible scintigraphic guide for surgery? *Tumori*, v. 88(3), s. 28-30, 2002.

129. SMITH, C.J.; VOLKERT, W.A. & HOFFMANN, T.J. Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. *Nucl. Med. Biol.*, v. 32(7), p. 733-740, 2005.
130. LANTRY, L.E.; CAPELETTI, E.; MADDALENA, M.E., et al. ¹⁷⁷Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J. Nucl. Med.*, v. 47(7), p. 1144-1152, 2006.
131. SCHALLY, A.V. & NAGY, A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 141, p. 1-14, 1999.
132. AZAY, J.; GAGNE, D.; DEVIN, C., et al. JMV641: a potent bombesin receptor antagonist that inhibits Swiss 3T3 cell proliferation. *Reg. Pept.*, v. 65(1), p. 91-97, 1996.
133. MARQUEZ, C.; TRESTON, A.; MOODY, E., et al. The metabolism of BW2258U89, a GRP receptor antagonist. *Neuropeptides*, v. 34(2), p. 108-115, 2000.
134. MOODY, T.W.; LEYTON, J.; GARCIA-MARIN, L.J. & JENSEN, R.T. Nonpeptide gastrin releasing peptide receptor antagonists inhibit the proliferation of lung cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 474, p. 21-29, 2003.

135. SZEPEHAZI, K.; SCHALLY, A.V.; HALMOS, G., et al. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and Mrna expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 94(20), p. 10913-10918, 1997.
136. MIYAZAKI, M.; LAMHARZI, N.; SCHALLY, A.V., et al. Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrinreleasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095. *Eur. J. Cancer*, v.
137. KOPPAN, M., HALMOS, G.; ARENCIBIA, J.M., et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. *Cancer*, v. 83(7), p. 1335-1343, 1998.
138. CHATZISTAMOU, I.; SCHALLY, A.V.; SUN, B., et al. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c- jun and c- fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br. J. Cancer*, v. 83(7), p. 906-913, 2000.
139. STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A.V., VARGA, J.L., et al. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. *Clin. Cancer Res.*, v. 11(1), p. 49-57, 2005.

140. KIARIS, H.; SCHALLY, A.V.; SUN, B., et al. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene*, v. 18(50), p. 7168-7173, 1999.
141. FLORES, D.G., Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Res Bull.* 2010 Mar 4. [Epub ahead of print]
142. PLONOWSKI, A.; SCHALLY, A.V.; VARGA, J.L., et al. Potentiation of the inhibitory effect of growth hormone-releasing hormone antagonists on PC-3 human prostate cancer by bombesin antagonists indicative of interference with both IGF and EGF pathways. *Prostate*, v. 44(2), p. 172-180, 2000.
143. LIU, X.; CARLISLE, D.L.; SWICK, M.C.; et al. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp. Cell. Res.*, v. 313(7), p. 1361-1372, 2007.
144. ZHANG, Q.; BHOLA, N.E.; LUI, V.W; et al. Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.*, v. 6(4), p. 1414-1424, 2007.
145. CORNELIO, D.B.; ROESLER, R. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann. Oncol.*, v. 18 (9), p. 1457-1466, 2007.

146. BARTHOLDI, M.F.; WU, J.M.; PU, H. & TRONCOSO, P. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 79(1), p. 82-90, 1998.
147. MARKWALDER, R. & REUBI, J.C. Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res.*, v. 59, p. 1152-1159, 1999.
148. CHAVE, H.S.; GOUGH, A.C.; PALME, K., et al. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br. J. Cancer* 2000; v. 82(1), p. 124-130, 2000.
149. PANSKY, A.; DE WEERTH, A.; FASLER-KAN, E., et al. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 11(8), p. 1409-1418, 2000.
150. SEBESTA, J.A.; YOUNG, A.; BULLOCK, J., et al. Gastrin-releasing peptide: a potential growth factor expressed in human neuroblastoma tumors. *Curr. Surg.*, v. 58(1), p. 86-89, 2001.
151. LANGO, M.N.; DYER, K.F ; LUI, V.W., et al. Gastrin-releasing peptide receptormediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Nat. Canc. Inst.*, v. 94(5), p. 375-383, 2002.

152. REUBI, J.C. ; WENGER, S. ; SCHMUCKLI-MAURER, J., et al. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I- [D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14). *Clin. Cancer Res.*, v. 8(4), p. 1139-1146, 2002.
153. SUN, B.; HALMOS, G.; SCHALLY, A.V., et al. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*, v. 42(4), p. 295-303, 2000
154. FLEISCHMANN, A.; WASER, B.; GEBBERS, J.O. & REUBI, J.C. Gastrin releasing peptide receptors in normal and neoplastic human uterus: involvement of multiple tissue compartments. *The J. Clin. Endocrinol. & Metabol.*, v. 90(8), p. 4722-4729, 2005.

6 - ARTIGO

Gastrin-releasing peptide receptor expression in human hepatocellular carcinoma, cirrhosis and normal hepatic tissue

Lazaretti NS^{1,2}, de Macedo BR^{1,3}, Izetti P^{1,3,4}, Meurer L^{1,5}, Rodriguez R⁶, Schwartsmann G^{1,2,3,7}

1 Cancer Research Laboratory, Academic Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

2 Medical Sciences Graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

3 School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

4 Genetics and Molecular Biology Graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

5 Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

6 Institute of Pathology of Passo Fundo

7 Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Nicolas Lazaretti, MD, MSc; Laboratório de Pesquisa em Câncer, Centro de Pesquisa Experimental; Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS (Brazil); tel. +55 51 3359 7616; email: nicolaslazaretti@yahoo.com.br

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a malignancy with a poor prognosis, showing a high relapse and mortality rates despite the use of available treatment modalities. The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is highly expressed and a potential therapeutic target in various types of malignancies, such as glioma, prostatic, ovarian and renal carcinomas, being a potential therapeutic target in these diseases. However, the literature on the GRPR expression in HCC is scanty. In this study, we looked at GRPR expression in tumor samples obtained from patients with HCC, as well as cirrhotic and normal hepatic tissue. To the best of our knowledge, this is the first study to confirm the presence of GRPR in tumor samples obtained from patients with HCC.

INTRODUCTION

Bombesin/gastrin-releasing peptides (BN/GRP) were demonstrated to bind selectively to cell surface receptors, acting as autocrine mitogenic stimuli for the growth of various types of malignancies in culture [1]. BN/GRP receptors are expressed on a wide variety of tumors, including small lung carcinoma, gliomas, pancreatic, prostatic, breast and ovarian cancers [2,3].

Notably, BN/GRP receptor antagonists, such as RC-3095, were shown to produce long-lasting tumor regressions in various *in vivo* murine and human tumor models carcinomas [4,5,6]. Following the binding of RC-3095 to BN/GRP receptors, a down-regulation of EGF and VEGF receptors was observed [7]

In our laboratory, we have looked at biopsy specimens obtained from patients with cervical cancer, and a high expression of BN/GRP receptors was observed [8]. In addition, using an *in vivo* rat glioma model, we were able to demonstrate significant tumor responses with the combined use of temozolamide and RC-3095 [9]. More recently, a high GRPR content was also observed in human glioma samples by our group [10]

Considering its novel mechanism of action, as well as the lack of dose-limiting toxicities of RC- 3095 in animal studies, we have decided to perform a Phase I trial of this agent in patients with advanced and refractory malignancies. An analytical method for the measurement of RC- 3095 in human plasma was also developed by our group [11]. Interestingly, our data confirmed the safety of RC- 3095 in a series of 25 cancer patients, and evidence of antitumor effects was also shown [12]

The present study is part of our effort to identify tumor types that could be suitable for this experimental therapeutic intervention in early Phase II clinical trials. For that purpose, our approach consisted in the evaluation of sizeable series of paraffin biopsy samples obtained from cancer patients with different types of cancers who were treated

at our institution. Tumor types exhibiting a high GRPR expression ratio between tumor/normal tissue are potential candidates to be considered for clinical trials with the GRPR antagonists RC-3095.

HCC is the fifth most common cancer worldwide and the most common form of liver cancer, being responsible for 80% of primary malignant tumors in adults, and frequently occurs in the setting of chronic liver disease and cirrhosis [13]. HCC is highly resistant to the available chemotherapeutic agents, administered either alone or in combination [14], and the median survival following diagnosis ranges from approximately 6 to 20 months [15,16,17]

The available literature on the expression of BN/GRP receptors in HCC is scanty. Some experimental studies indicate that bombesin is present in rat hepatocellular tumors [18,19]. In one study, the occurrence of BN/GRP receptors in human hepatic cancers transplanted in nude mice was reported, and cytotoxic peptide analogs targeted to these receptors inhibit growth of this tumor [20]. In the present study, we describe the BN/GRP receptor expression in a series of paraffin blocs obtained from patients with HCC treated at our institution. We have also investigated whether the expression of GRPR could be a predictor of clinical outcome.

MATERIALS AND METHODS

Materials

A retrospective search in our archives between 2004 and 2009 showed that 87 patients were found to have the diagnosis of HCC, leading to 79 tissue samples identified from the pathology records of the Department of Pathology of our Institution. After pathological review, 61 samples of representative paraffin wax block were processed by immunohistochemical technique and included in the study.

During the pathological review of the cancer tissues, an additional 30 samples of cirrhotic surrounding tissue and 22 samples of non-neoplastic and non-cirrhotic tissue from patients without cancer were selected as controls. Samples of normal tissue were hard to obtain from the same patients considering that a high proportion of cases were provided by incisional biopsy, not being associated with a large amount of tissue available for the study.

Clinical data were available in all 61 HCC cases and patients were followed up after histological diagnosis for a median follow-up time of survival cases of 7 months (range: 1–108 months; SD \pm 21.9).

Immunohistochemistry (IHC)

IHC was performed on formalin-fixed paraffin-embedded samples of HCC tissues held by the Department of Pathology. The blocks were cut into 4-*mm*-thick sections and mounted on microscope slides. The primary antibody used was a rabbit polyclonal antibody anti-GRPR (#OPA1-15619, Affinity Bioreagents, USA). After dewaxing, inactivating endogenous peroxidase activity and blocking cross-reaction with normal serum, 4 μ m sections were incubated overnight at 4° C with a diluted solution of the primary antibody (1: 50). 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, DakoStaining).

Assessment of Staining Patterns

For each antibody, a pathologist scored the staining intensity (0 = no staining; 1+ = weak staining; 2+ = moderate staining; 3+ = strong staining) of tumor areas and adjacent tissue for all the specimens. Specimens in which one or more tumor areas with different staining intensities were present were scored for the most prevalent intensity. Specimens with focal uptake amidst negative cancer tissue scored 1+. For the purposes of data presentation, GRPR expression was classified as “low” if the sum score of

intensity was $\leq +1$ and as “high” if score was between +2 and +3 (moderate to strong staining).

Statistical analysis

Data were evaluated using SPSS 14.0. Significant differences between GRPR expression among lesions and surrounding tissues were evaluated using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney tests. Correlation between GRPR expression and clinicopathologic variables was evaluated using a χ^2 test. Kaplan-Meier survival curves were calculated using tumor recurrence (defined as the first appearance of a tumor at any site following definitive treatment) or death as the end points. The difference of overall survival curve or disease-free survival curve was examined by log-rank test. Adequacy of sample size was determined by power analysis. Data are expressed as means \pm SE, unless otherwise specified, with $P < 0.05$ considered significant.

RESULTS

Sample characteristics are described in Table 1. The mean age at cancer diagnosis was 59.0 years (SD=13.1; range: 14-83 years). Among the 61 patients with available clinical information, 55.9% were stage II or IV disease, 67.2 (n=41) had cirrhotic liver and 61% (n=36/59) were HCV positive.

Table 1. Clinical description of the sample studied (n = 61).

Characteristic	n	%	Mean (\pm SD)
Sex			
Female	19	31,1	
Male	42	68,9	
Age at diagnosis (years)			59.0 (13.1) range: 14-83
HCV			
Absent	23	61.0	
Present	36	39.0	

Liver cirrhosis

Absent	20	32.8
Present	41	67.2

Tumor stage

I	15	25.4
II	11	28.6
III	26	44.0
IV	7	11.9

Vascular invasion

Absent	34	85.0
Present	6	15.0

GRPR immunoexpression was demonstrated in the parenchymal tumor cells in 77% of tumor tissue samples (47/61) and was moderately to strongly expressed in 57.4% of these cases (Fig 1). In adjacent non-cancerous hepatocellular tissue, GRPR immunostaining was also observed, showing a high expression in 15/31 of cases (48.4%).

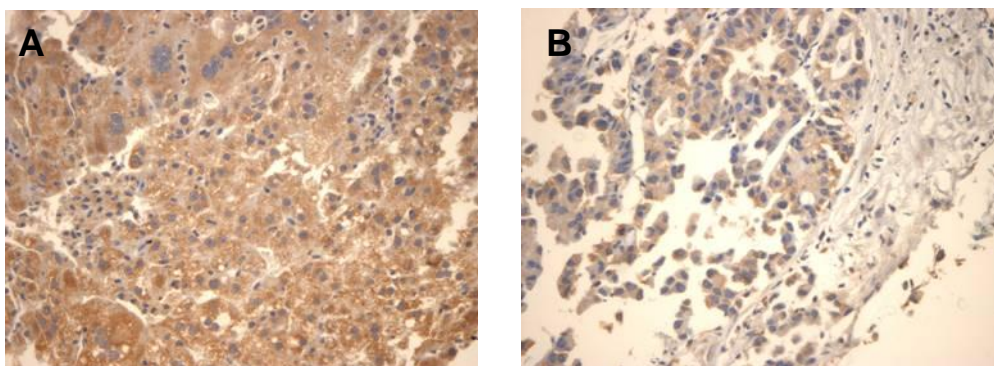


Figure 1. Antibody staining in hepatocellular carcinoma tissues. **(A)** GRPR immunoexpression in HCC positive strong staining x 200 and **(B)** weak expression.

In the non-cirrhotic and non-malignant tissues, GRPR was also expressed, mostly with a weak to moderate expression (36.4% and 59.1%, respectively). It was not observed a significant difference in GRPR expression among the malignant processes and the adjacent tissues by Kruskal-Wallis analysis of variance. The Mann-Whitney test was also not able to demonstrate a statistical significant difference in the GRPR expression

among neoplastic and cirrhotic or adjacent normal tissue ($p=0.867$). Figure 2 shows the overall GRPR expression in malignant and normal tissues. Though the overall analysis of variance did not show any difference between tissues, individual comparisons showed a significantly higher expression of score 3+ (strong expression) in malignant tissue as well as absence of expression, $p<0.05$ (Table 2).

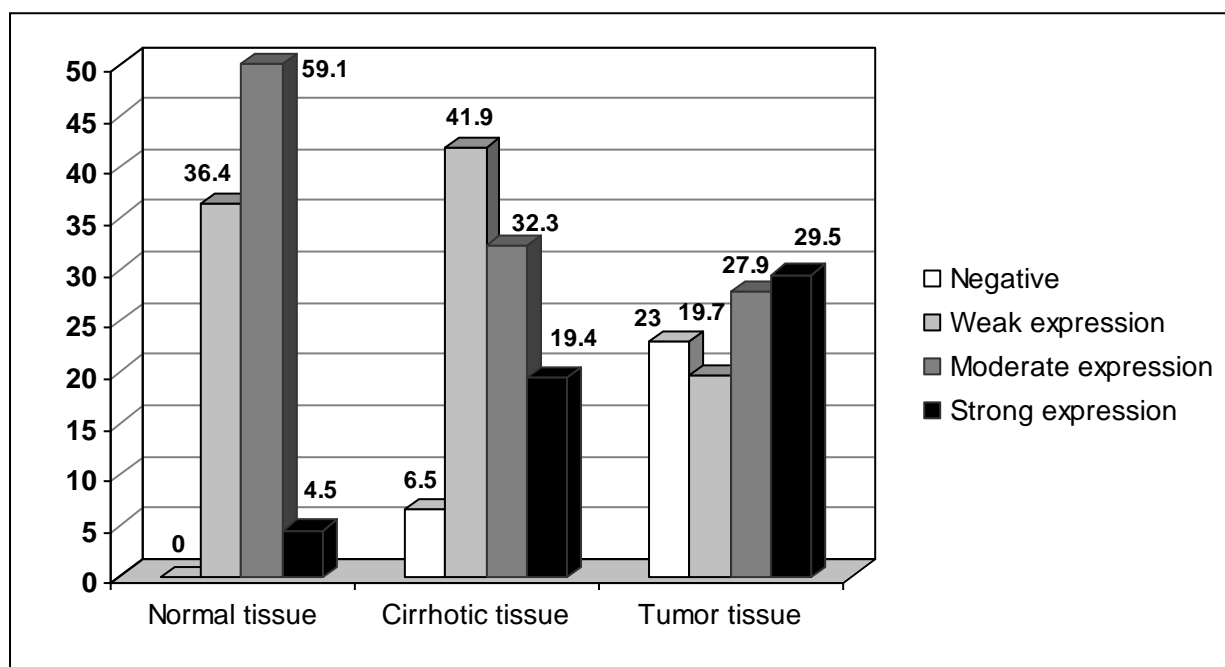


Figure 2. Overall expression of GRPR in HCC ($n=61$) compared with surrounding cirrhotic tissue ($n=31$) and normal hepatocellular tissue ($n=22$), $p=0.867$. Although tumor tissue expressed diffuse immunopositivity with the majority exhibiting a strong staining pattern compared with cirrhotic and normal tissue, general expression was not different among normal and neoplastic tissue ($p=0.867$).

Table 2. Staining intensity of GRPR expression in normal liver and HCC tissue.

Staining intensity score	Pathological characterization		P value
	Normal tissue (%) n=22	Malignant tissue (%) n=61	
Score 0 (no staining)	0	23	0.033
Score 1+ (weak staining)	36.4	19.7	0.191
Score 2+ (moderate staining)	59.1	27.9	0.015
Score 3+ (strong staining)	4.5	29.5	0.041

To better understand the significance of GRPR expression in HCC, we correlated the expression level with major clinicopathologic features. GRPR expression was significantly associated with tumor stage ($P=0.047$), but no correlation was observed with other clinicopathologic parameters (age, gender, virus, liver cirrhosis, tumor size, and AFP level) ($P > 0.05$) (Table 3).

Table 3. Correlation of different clinicopathologic features with GRPR expression in HCC

Clinicopathologic characteristics	All Patients (n=61)		<i>P</i> value
	GRPR expression (n= 35)	low GRPR expression (n=26)	
Age			
< 55y	11	9	0.793
≥ 55y	24	17	
Gender			
Male	23	19	0.539
Female	12	7	
HbsAG			
Absent	30	24	0.190
Present	5	1	
HCV			
Absent	14	9	0.687
Present	20	16	
Liver cirrhosis			
Absent	12	8	0.772
Present	23	18	
Tumor stage			
I	5	10	0.047
II	5	6	
III & IV	23	10	
Histological grade			
Well	3	3	0.551
Moderate to poor	22	13	
AFP level			
< 100 ng/ml	17	13	0.973
≥ 100 ng/ml	12	9	

Tumor size			
< 5 cm	14	15	
≥ 5 cm	20	11	0.205

During the follow-up observation period, locoregional recurrence or distant metastases occurred in 5 of the 20 patients (25%) that underwent procedures with curative intent (hepatectomy or transplant) and death was confirmed in 65% of patients with valid information (33/51).

To assess the prognostic significance of GRPR expression, we analyzed overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) rates using the Kaplan-Meier method. At the 5-year follow-up, approximately 40.3% of the patients with low GRPR expression survived, whereas 13.8% of the patients with high GRPR expression survived. Estimated mean for survival time in the group with high GRPR expression was 21.6 months, whereas in patients with low GRPR expression it was 42.6 months (Figure 3). Similarly, at the 2-year follow-up of patients submitted to hepatectomy or transplant, approximately 79.5% of the patients with low GRPR expression were disease-free, whereas 43.8% with high GRPR expression were free of relapse (Figure 4). The logrank test showed that patients who expressed higher GRPR staining tended to have a shorter overall survival time ($p = 0.174$) and disease-free survival time ($p = 0.188$), but no significant relation was found.

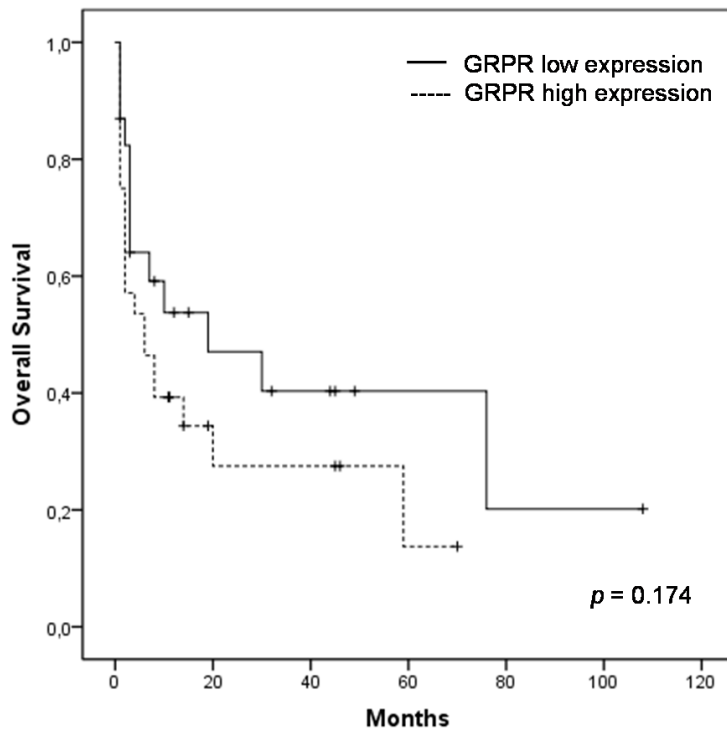


Figure 3. Kaplan-Meier curves for OS of patients with high and low GRPR expression in HCC tissue. Patients with high GRPR expression tended to have a shorter OS time ($p = 0.174$) compared to patients with low expression.

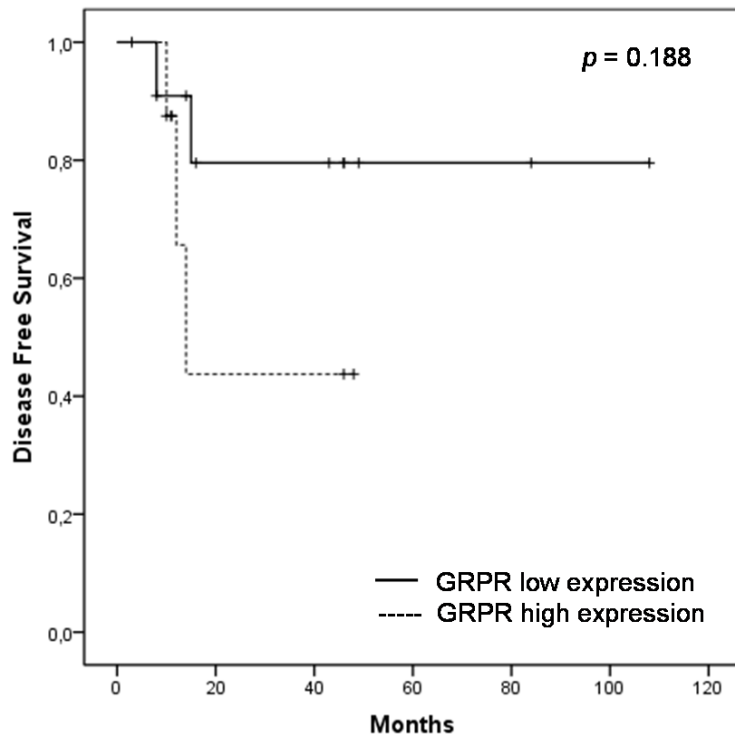


Figure 4. DFS in patients with high and low GRPR expression with no evidence of disease after surgery. Patients with high GRPR expression relapsed earlier than patients with low expression ($p=0.188$).

DISCUSSION

This study focused on evaluating GRPR as a potential target for new molecular therapies against HCC. This is the first study looking at the GRPR expression in tissue samples obtained from patients with HCC using immunohistochemical methods. Additional samples obtained from cirrhotic and normal liver tissue from patients were used as controls.

We were able to demonstrate the presence of abundant expression of GRPRs in human hepatocellular carcinoma, while cirrhotic and normal tissues had a less pronounced receptor density, though it was also expressed. Bombesin expression in HCC was defined in primary rat liver cancers by immunohistochemical methods and was found in neurosecretory granules in 13% of the nodules and 29% of the hepatocellular carcinomas. Normal, peritumorous liver tissue, including the frequent atypical foci present in the latter two categories, was negative for this marker [18,19].

The above mentioned authors suggested that des-differentiation of altered hepatocytes in a neuroendocrine direction could be a late event in liver carcinogenesis, thereby contributing to tumor formation. Our study provides a different perspective, since GRPR was also expressed in surrounding cirrhotic tissues and normal liver, though less pronounced than in neoplastic lesions.

In a previous study the treatment of peptide analogs targeted to receptors for luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin or BLP and their combinations strongly inhibit growth HCC in nude mice [20].

The GRP receptors in the primary carcinomas are often heterogeneously distributed. BLP play many physiological roles including the regulation of smooth muscle

contraction, the release of hormones and the secretion of enzymes [5], occurring in peripheral blood cells from healthy subjects [21] and in several organs, such as breast lobules and ducts [22], the gastric antrum [23] and the pancreas [24].

In our study, we describe a ubiquitous GRPR expression in non-neoplastic liver tissue, ranging from moderate to high density values. The reason for such a heterogeneity in normal tissue is not clear and needs further investigations. Considering that the sample size containing non-neoplastic tissue was often small, the percentage of receptor heterogeneity may not be representative for the whole liver parenchyma. The observed heterogeneity could be related to a heterogeneous innervation pattern, assuming that GRP plays a neurotransmitter role in the liver, as it does in the other gastrointestinal organs previously evaluated.

Together with defining GRPR expression in HCC, we tried to determine the correlation between its expression and the clinical outcome in patients. In the specimens examined, GRPR expression status was mainly observed in tumors of moderate to poor differentiation, while well differentiated carcinomas lacked GRPR expression ($p=0.55$).

Furthermore, it appears to be a correlation of GRPR high expression and relapse after hepatectomy, since 57.1% of patients who relapsed were GRPR-positive, in comparison to 42.9% of those who had no evidence of disease in the follow-up. Even though it did not reach statistical significance, it could be inferred that GRPR expression might be related to the aggressiveness of the disease. Such finding has also been observed in studies with GRPR expression in prostate cancer [25], in which positive immunoexpression of GRP was clearly associated with relapse ($p=0.029$) and advanced tumor stages ($p=0.049$).

Several lines of experimental evidence have suggested that the GRP and other BLP are involved with tumor progression, enhancing angiogenesis, local invasion and distant metastases [3]. However, some series have shown that, at least in vitro, GRP/GRPR may actually improve patient outcome. It could be associated with a capacity of

enhancing tumor cell attachment to the extracellular matrix [26,27], attenuating metastasis and promoting natural killer (NK) cell binding and cytotoxicity [28].

Considering the different possible functions suggested for GRP, many studies have assessed the role of GRPR as a prognostic factor for different types of cancer. Studies on lung and colorectal cancer showed that aberrant expression of this peptide receptor was not associated with worse clinical outcome, since patients expressing GRPR had better survival rates when compared with patients with no GRPR expression [29,30].

As in other studies performed in samples obtained from patients with breast and prostate cancer [25,31], our results in HCC suggested that GRPR expression had a negative impact in overall patient survival. The expression of GRPR could correlate with patient survival or tumor recurrence even when GRP expression does not [32]. That could be due to other ligands in the bombesin family that activates the GRPR and also to the susceptibility of being constitutively active, at least when ectopically expressed in a non-malignant human cell line [33].

The observation that GRPR could act as an autocrine growth factor for several tumors have encouraged the synthesis of GRPR antagonists for the experimental treatment of different malignancies. The synthetic antagonists bind with high affinity to the receptors, blocking the signaling pathways, and have exhibited antitumor activity both *in vitro* and *in vivo* [34].

The high GRPR expression in a large spectrum of human cancers, as well as the demonstration of its role as a tumor growth factor in various tumor models gives support to the clinical evaluation of GRPR antagonists as experimental anticancer agents [3]. In various tumor types, such as prostate and cervical cancer and, more recently, gliomas, a sizeable difference between GRPR expression between neoplastic and non-neoplastic tissues could be demonstrated [8,10,35,36].

Our study is the first to look at GRPR expression in tumor samples obtained from patients with HCC, as well as in tissue biopsies of cirrhotic and normal liver. GRPR was shown to be expressed in both non-malignant and malignant tissue. However, it had a high differential expression in high grade HCC as compared to normal liver tissue. We were also able to demonstrate that GRPR expression was associated with poor patient outcome. The relatively small sample size in our study limits any definitive conclusion and further studies on GRPR expression in patients with HCC are warranted.

REFERENCES

1. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J et al (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*; 316: 823–826.
2. Nagy A, Schally AV (2005) Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancers expressing their receptors: a 'smarter' chemotherapy. *Curr Pharm Des*; 11: 1167–1180.
3. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18(9):1457-66.
4. Costa M, Furness JB, Yanaihara N, Yanaihara C and Moody TW (1984) Distribution and projections of neurons with immunoreactivity for both gastrin-releasing peptide and bombesin in the guinea-pig small intestine, *Cell Tissue Res*. 235:285–293.
5. Bunnett N: Gastrin releasing peptide; in Walsh JH, Dockray GJ (eds): *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. New York, Raven Press, 1994, pp 423–445.
6. Hildebrand P, Lehmann FS, Ketterer S, Christ AD, Stingelin T et al (2001) Regulation of gastric function by endogenous gastrin releasing peptide in humans: studies with a specific gastrin releasing peptide receptor antagonist, *Gut* 49: 23–28
7. Schally AV, Chang RC, Arimura A, Redding TW, Fishback JB, Vigh S. High molecular weight peptide with corticotropin-releasing factor activity from porcine hypothalami. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Aug;78(8):5197-201.
8. Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, Schwartzmann G (2008) Gastrin-Releasing Peptide Receptor Expression in Cervical Cancer. *Oncology* 73:340–345.
9. de Oliveira MS, Cechim G (2009) Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol*. 93(2):203.
10. Flores GD, Meurer L, Uberti AF, Macedo BR, Lenz G, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R. Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Research Bulletin* 82, 95-98, 2010.

11. Pereira AS, DiLeone L, Souza FH, Schwartzmann G, De Nucci G. Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Feb 25;816(1-2):321-6.
12. Schwartzmann G., A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies *Invest New Drugs.* 2006 Sep;24(5):403-12.
13. Parkin DM Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001 Sep;2(9):533-43.
14. Llovet JM, Beaugrand M (2003) Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects. *Journal of Hepatology*, 38:S136-149.
15. Giovannini M, Elias D, Monges G, Raoul JL, Rougier P (2001) Hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 84:74–7.
16. Moffat DF, Oien KA, Dickson J, Habeshaw T, McLellan DR (2000) Hepatocellular carcinoma after long-term tamoxifen therapy. *Ann Oncol* 11:1195–6.
17. Poon RT, Ng IO, Fan ST, Lai EC, Lo CM et al (2001) Clinicopathologic features of long-term survivors and disease-free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. *J Clin Oncol* 19:3037–44.
18. Seglen PO, Skomedal H, Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM. Neuroendocrine differentiation and bombesin production in carcinogeninduced hepatocellular rat tumours. *Carcinogenesis* 1989;10:21–25.
19. Nilsson H, Eriksson LC. Growth factor induced mitogenic effects and inositol phosphate responses in primary hepatocyte cultures from normal rat liver and rat liver nodules. *Carcinogenesis* 1994; 15:1821–1826.
20. Szepeshazi K, Schally AV, Treszl A, Seitz S, Halmos G. *Anticancer Drugs.* 2008 Apr;19(4):349-58. Therapy of experimental hepatic cancers with cytotoxic peptide analogs targeted to receptors for luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin or bombesin.
21. Shingyoji M, Takigushi Y, Watanabe R, Hiroshima K, Motoori K, Kurosu K, et al: Detection of tumor specific gene expression in bone marrow and peripheral blood from patients with small cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1057–1062.
22. Gugger M, Reubi JC (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 155: 2067–2076.

23. Ferris HA, Carroll RE, Lorimer DL, Benya RV (1997b) Location and characterization of the human GRP receptor expressed by gastrointestinal epithelial cells. *Peptides*; 18: 663–672.
24. Xiao D, Wang J, Hampton LL, Weber HC. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene* 2001; 264: 95–103.
25. Constantinides C, Lazaris AC, Haritopoulos KN, Pantazopoulos D, Chrisofos M et al (2003) Immunohistochemical detection of gastrin releasing peptide in patients with prostate cancer. *World J Urol* 21: 183–187.
26. Glover S, Delaney M, Dematte C et al (2004) Phosphorylation of focal adhesion kinase tyrosine 397 critically mediates gastrin-releasing peptide's morphogenic properties. *J Cell Physiol* 199:77–88.
27. Taglia L, Matusiak D, Matkowskyj KA et al (2007) Gastrin-releasing peptide mediates its morphogenic properties in human colon cancer by up-regulating intracellular adhesion protein-1 (ICAM-1) via focal adhesion kinase. *Am J Physiol* 292:G182-G190
28. Taglia L, Matusiak D, Benya RV (2008) GRP-induced up-regulation of Hsp72 promotes CD167/94 natural killer cell binding to colon cancer cells causing tumor cell cytolysis. *Clin Exp Metastasis* 25:451–463
29. Toi-Scott M, Jones CL, Kane MA (1996) Clinical correlates of bombesin-like peptide receptor subtype expression in human lung cancer cells. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 15:341-354.
30. Carroll RE, Matkowskyj KA, Chakrabarti S et al (1999) Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well differentiated colon cancers in humans. *Am J Physiol* 276:G655–G665
31. Chao C, Ives K, Hellmich HL, Townsend CM Jr, Hellmich MR (2009) Gastrin-releasing peptide receptor in breast cancer mediates cellular migration and interleukin-8 expression. *J Sur Res* 156(1):26-31.
32. Rivera CA, Ahlberg NC, Taglia L, Kumar M, Blunier A et al (2009) Expression of GRP and its receptor is associated with improved survival in patients with colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 26(7):663-71.
33. Ferris HA, Carroll RE, Rasenick MM et al (1997a) Constitutive activation of the gastrin-releasing peptide receptor expressed by the non-malignant human colon epithelial cell line NCM460. *J Clin Invest* 100:2530–2537.

34. Moody TW, Sun LC, Mantey SA et al (2006) In vitro and in vivo antitumor effects of cytotoxic camptothecin-bombesin conjugates are mediated by specific interaction with cellular bombesin receptors. *J Pharmacol Exp Ther*; 318 (3): 1265–1272.
35. Bartholdi MF, Wu JM, Pu H, Troncoso P (1998) In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 79: 82–90.
36. Markwalder R, Reubi JC (1999) Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res* 59: 11

7 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

7.1 Seleção da Amostra

Foram selecionadas 79 lesões hepáticas do arquivo de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período compreendido entre janeiro de 2004 a março de 2009.

As amostras constaram de 61 casos de hepatocarcinoma. Para cada lesão foi selecionado um bloco de parafina representativo, preferencialmente aquele em que os tecidos hepáticos adjacentes estivessem presentes, o que não foi viável na totalidade das amostras.

7.2 Resultados

As características das amostras são descritas na tabela 3. A média de idade no diagnóstico do câncer foi de 59 anos (variando entre 14-83 anos). Entre os 61 pacientes com informações clínicas disponíveis, 55,9% eram estágio II ou IV, 67,2% (n=41) possuíam fígado cirrótico e 61% (n=36/59) eram HCV positivo.

Tabela 3. Descrição das amostras do estudo (n = 61).

Características	n	%	Média
Gênero			
Feminino	19	31,1	
Maculino	42	68,9	
Idade no diagnóstico (anos)			59.0 variação: 14-83
HCV			
Ausente	23	61.0	
Presente	36	39.0	

Cirrose Hepática		
Ausente	20	32.8
Presente	41	67.2
Estágio do tumor		
I	15	25.4
II	11	28.6
III	26	44.0
IV	7	11.9
Invasão vascular		
Ausente	34	85.0
Presente	6	15.0

A imunexpressão do GRPR foi demonstrada em 77% dos tecidos tumorais (47/61) e com padrão de moderado a forte em 57,4% dos casos. No tecido cirrótico adjacente ao câncer, a imunexpressão do GRPR foi, também, observada, demonstrando alta expressão em 48,4% dos casos (15/31). No tecido hepático normal adjacente ao câncer, a imunexpressão foi observada de intensidade fraca a moderada (36 e 59% respectivamente) Não foi observada uma diferença significativa na expressão do GRPR entre a neoplasia hepatocelular e o tecido celular sadio, através da análise estatística de Kruskal-Wallis. O teste de Mann-Whitney também não demonstrou diferença, estatisticamente significativa, na expressão do GRPR no tecido neoplásico e cirrótico ou tecido normal ($p=0.867$). A figura 6 demonstra a expressão global do GRPR em tecido neoplásico e normal.

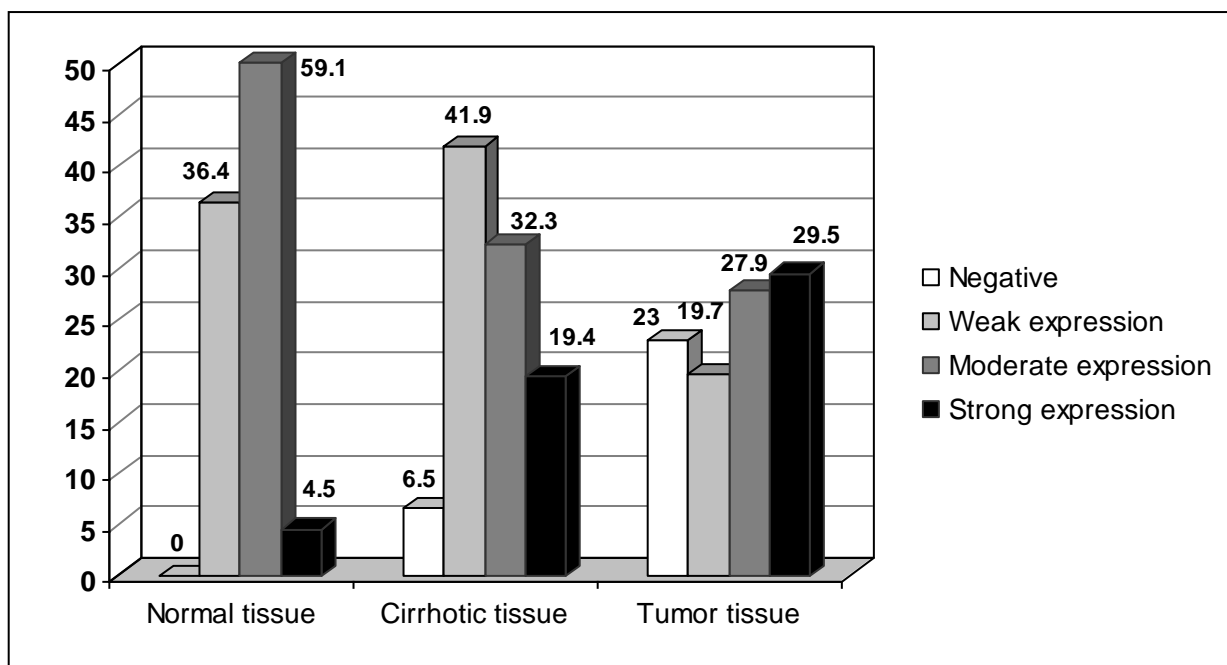


Figura. 5. Expressão global do GRPR no carcinoma hepatocelular e no tecido adjacente normal e cirrótico

Para melhor entender a significância da expressão do GRPR no HCC, correlacionamos o nível de expressão com os achados clinicopatológicos. A expressão do GRPR foi significativamente associada com o estágio do tumor ($p=0.047$), entretanto não houve correlação com outros parâmetros clinicopatológicos como idade, gênero, infecção pelo vírus da hepatite, presença de cirrose hepática, tamanho do tumor e nível da AFP ($p>0.05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação de diferentes achados clinicopatológicos com a expressão do GRPR no HCC.

Características clinicopatológicas	Todos os pacientes (n=61)		Valor do p
	Expressão baixa do GRPR	Expressão forte do GRPR (n=26)	

(n= 35)

Idade			
< 55y	11	9	
≥ 55y	24	17	0.793
Gênero			
Masculino	23	19	
Feminino	12	7	0.539
HbsAG			
Ausente	30	24	
Presente	5	1	0.190
HCV			
Ausente	14	9	
Presente	20	16	0.687
Cirrose hepática			
Ausente	12	8	
Presente	23	18	0.772
Estágio do tumor			
I	5	10	
II	5	6	
III & IV	23	10	0.047
Grau histológico			
Bem diferenciado	3	3	
Moderado a pobre	22	13	0.551
Nível de AFP			
< 100 ng/ml	17	13	
≥ 100 ng/ml	12	9	0.973
Tamanho do tumor			
< 5 cm	14	15	
≥ 5 cm	20	11	0.205

Durante o período de observação, a recorrência locorregional ou as metástases à distância ocorreram em 5 de 20 pacientes (25%) que foram submetidos a procedimento com intenção curativa (hepatectomia ou transplante) e a morte foi confirmada em 65% dos pacientes com informações válidas (33/55).

Para determinar a significância estatística da expressão do GRPR como fator prognóstico, analisamos as taxas de sobrevida global (OS) e da sobrevida livre de doença (DFS) usando o método de Kaplan-Meier. Com um acompanhamento de 5 anos, aproximadamente 40,3% dos pacientes com expressão baixa do GRPR estavam vivos, enquanto apenas 13,8% dos pacientes com alta expressão também estavam. O tempo médio de sobrevida para o grupo onde houve uma grande expressão do GRPR foi 21.6 meses, enquanto os pacientes com baixa expressão foi de 42.6 meses. (Figura 7). Igualmente, com um acompanhamento de 2 anos, os pacientes submetidos à hepatectomia ou transplante, aproximadamente 79,5% dos pacientes com baixa expressão do GRPR estavam livres de doença, enquanto apenas 43,8% daqueles que apresentavam alta expressão estavam livres de recorrência (Figura 8). O teste de logrank demonstrou que os pacientes que expressaram grande marcação pelo GRPR tenderam a apresentar um tempo de sobrevida global ($p=0.174$) e sobrevida livre de doença pior quando comparados àqueles com baixa expressão ($p=0.188$).

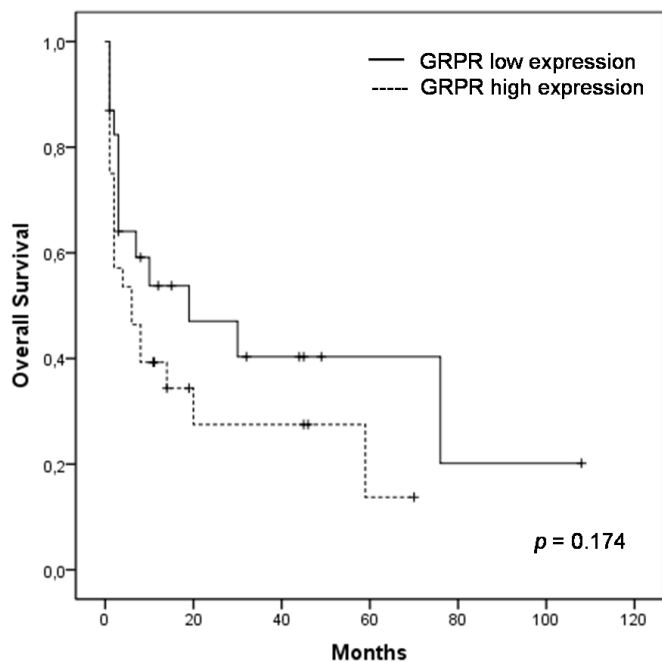


Figura 6. Curvas de Kaplan-Meier para OS de pacientes com alta e baixa expressão do GRPR no HCC.

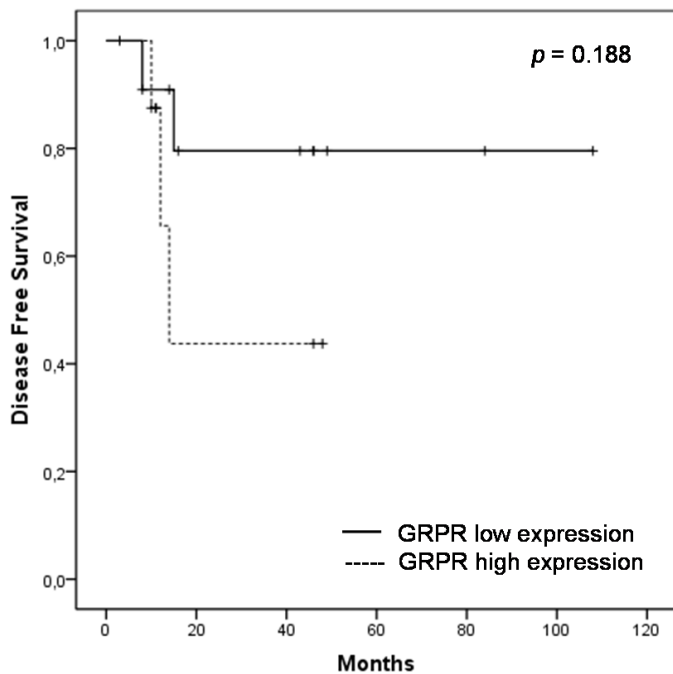


Figura 7. Sobrevida livre de doença em pacientes com expressão alta e baixa do GRPR sem evidências de doença após a cirurgia.

8 – PERSPECTIVAS

Esse é o primeiro estudo que avalia, em seres humanos, a expressão do GRPR no HCC, tecidos hepáticos adjacentes (cirrótico e normal) e sua relação com fatores prognósticos. Foi utilizada a técnica de imunistoquímica para a determinação da superexpressão desse receptor, entretanto acreditamos que o ideal será fazer a quantificação do GRPR por expressão gênica com PCR real time para confirmar esses resultados, pois a técnica da graduação por imonoistoquímica é subjetiva e operador dependente.

Outro aspecto importante e que pode melhorar ainda mais os resultados desse estudo é o aumento do tamanho da amostra, fazendo com que haja, principalmente, um aumento do poder estatístico.

9 – ANEXOS

9.1 Técnica de Imunoistoquímica

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

Foram realizados cortes de 4 micra de espessura, que foram desparafinizados em estufa e reidratados em álcool. 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 tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). Um corte de carcinoma de pâncreas foi utilizado como controle positivo, e, para o controle negativo, foi omitida a utilização do anticorpo primário.

9.2 Quantificação dos Resultados

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

Amostras que apresentaram uma ou mais áreas de tumor, com diferentes graus de intensidade, os resultados apresentados foram aqueles que mais prevaleciam na amostra.