

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

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE p16 E GRPR EM BIÓPSIAS
DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO E CÂNCER
DE ESÔFAGO**

DANIELLY BRUFATTO OLGUINS

Porto Alegre

2017

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

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE p16 E GRPR EM BIÓPSIAS
DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO E CÂNCER
DE ESÔFAGO**

DANIELLY BRUFATTO OLGUINS

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

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Olguins, Danielly Brufatto

Avaliação Imunohistoquímica de p16 e GRPR em
biópsias de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e
câncer de esôfago / Danielly Brufatto Olguins. -- 2017.

52 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Imunohistoquímica . 2. GRPR. 3. p16. 4.
Câncer de cabeça e pescoço . 5. Câncer de esôfago
. I. Schwartzmann, Gilberto, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio, não só durante o mestrado como na vida inteira, em especial, a pessoa que sempre cuidou de mim e nunca mediu esforços para eu ter tudo que eu gostaria e este ano infelizmente não estará presente para ver mais esta conquista minha, mas tenho certeza que sempre estará cuidando e torcendo por mim, pelas minhas irmãs e minha sobrinha onde quer que ela esteja. Serei eternamente grata.

Ao meu namorado, por sempre estar comigo me apoiando e me ajudando tanto nos momentos bons como nos momentos difíceis da vida.

Às minhas amigas de sempre, Mayara, Andréia e Daniela, por estarem sempre me apoiando e me incentivando em todas as minhas decisões.

Às amigas que o laboratório me deu, Camila, Kelly e Mirela por sempre estarem presente e me ajudarem tanto profissional como pessoalmente, sempre com um almoço para escutar minhas reclamações e alegrias, meu muito obrigada.

Ao pessoal do laboratório por todo o companheirismo e ajuda durante todo esse tempo, Rafa Santos, Mari Jaeger, Livia, Bárbara, Duda, Amanda, Matheus e Marco Aurélio.

A Carol Brunetto, por toda a orientação e ajuda e amizade durante todos esses anos de laboratório.

Ao professor Luiz Fernando Rivero, por toda ajuda e disponibilidade durante esses dois anos de mestrado.

Ao Rafael Roesler, por toda oportunidade e ajuda durante todos esses anos de laboratório.

Ao professor Gilberto, pela disponibilidade em me aceitar como orientanda, e por toda orientação dada e por ser sempre uma pessoa tão gentil e dedicada e super disponível- principalmente nesta reta final.

Aos demais, que infelizmente não lembro nessa breve escrita, minha eterna gratidão.

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Marino Bianchin (PPGCM-UFRGS)

Professor Doutor Fábio Klamt (PPGCM-UFRGS)

Professor Doutor Daniel Damin (PPGCC-UFRGS)

Professora Doutora Manoela Martins (PPG em Odontologia – UFRGS)

Doutora Daniela Baumann Cornélio (Médica-Mastologista Hospital Ernesto
Dorneles)

Doutora Caroline Brunetto de Farias (Coordenadora de Pesquisa Celular e
Molecular – Instituto do Câncer Infantil)

RESUMO

O câncer da região da cabeça e pescoço compreende as sublocalizações anatômicas da cavidade oral, faringe, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, cavidade nasal, seios paranasais e glândulas salivares e cada qual com características distintas em relação à epidemiologia, etiologia e prognóstico. Os dois principais fatores de risco são o alcoolismo e o tabagismo. Estudos mais recentes têm mostrado uma relação do papiloma vírus humano (HPV) com alguns tipos de câncer de cabeça e pescoço, tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da presença de HPV em tumores do epitélio escamoso. Embora ainda não exista um consenso estabelecido para esta aplicação. No câncer de esôfago, o HPV também tem sido considerado um fator de risco. Na literatura, a prevalência do HPV de alto risco foi de 89% no câncer cervical, 29% no câncer de cabeça e pescoço e 22% no câncer de esôfago. O receptor do peptídeo de liberador de gastrina (GRPR) é expresso em uma ampla variedade de neoplasias, incluindo os cânceres de próstata, mama, ovário, pulmão, cabeça e pescoço, gástrico, colon e reto, rim, esôfago e gliomas. Há também evidência da ocorrência de níveis elevados de GRPR na mucosa bucal de pessoas com câncer de cabeça e pescoço. Em muitos modelos experimentais, a ativação de GRPR também atua como estímulo à proliferação de células cancerosas. Considerando que possa existir uma interrelação nas vias de sinalização intracelulares através de ambos receptores em tumores epiteliais, esta dissertação busca investigar a expressão de p16 e GRPR em amostras de biópsias obtidas de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e de esôfago. Para isto, utilizou-se o método imunohistoquímico. Foram avaliados blocos de parafina de 92 pacientes com diagnóstico confirmado histopatologicamente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os resultados não evidenciaram uma relação entre a expressão imunohistoquímica de p16 e GRPR na amostra. Além disto, a expressão de p16 não foi eficaz como marcador da presença de HPV. Observou-se, contudo, níveis elevados de GRPR em cânceres de cabeça e pescoço e câncer de esôfago.

ABSTRACT

Head and neck cancer includes lesions at nine anatomical regions such as, oral cavity, pharynx, oropharynx, hypopharynx, nasopharynx, larynx, nasal cavity, paranasal sinuses and salivary glands. The two most studied risk factors for the development of these malignancies are tobacco and alcohol. More recently, human HPV has been also recognized as a risk factor for the development of these diseases, it has been proposed to use p16 as an indicator of the presence of HPV in squamous epithelial tumors. Although there is still no established consensus for this application. In the case of esophageal squamous cell carcinomas, HPV was recognized as a risk factor as well. In the literature, a prevalence of high-risk HPV was observed in 89%, 29% and 22% of cases of cervical, head and neck and esophageal cancer, respectively. The gastrin-releasing factor receptor (GRPR) was shown to be expressed in a variety of human cancer types, including prostate, breast, ovary, lung, head and neck, stomach, colorectal, kidney, esophagus cancers, as well as in gliomas. High GRPR expression has been also observed in oral mucosa of patients bearing head and neck neoplasms. In experimental tumors, GRPR activation is also correlated with tumor cell growth. Considering that a potential cross-talk between HPV-p16 and GRPR signalling pathways might exist in epithelial cancer cells, this research aimed at the study of p16 and GRPR expression in tumor samples obtained from patients with histopathologically confirmed head and neck and esophageal cancers. For that purpose, the immunohistochemical method was applied. Paraffin samples of 92 patients treated at Clinical Hospital of Porto Alegre were included in this analysis. The results showed no correlation between p16 and GRPR immunohistochemistry expression. Furthermore, p16 expression was not well correlated with the presence of HPV. Notably, elevated levels of GRPR expression was documented in the tumor samples.

LISTA DE FIGURAS DISSERTAÇÃO E ARTIGO

Dissertação:

Figura 1: Regiões que englobam o câncer de cabeça e pescoço. (Adaptado do National Cancer Institute, 2017).

Figura 2: HPV-E7 liga-se a Rb bloqueando-o, assim também inativando E2F. Acontecendo uma super expressão do E2F e os genes do ciclo celular, p16 tornando-se um marcador para câncer induzido por HPV. (Adaptado Ruhul Amin ARM, *et al.*, 2015).

Artigo:

Figura 1: *Relation of all p16 positive patients in relation to GRPR expression.*

Figura 2: *Expression of p16 in head and neck cancers in relation to esophageal cancer.*

Figura 3: Expression in relation to head and neck cancers and esophageal cancer.

Tabela 1: Patients' characteristics.

Tabela 2: *Relation with p16 positive and Patients characteristics.*

Tabela 3: *Relation with GRPR positive and Patients characteristics.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

INCA – Instituto Nacional do Câncer

NCI - *National Cancer Institute*

HPV – *Human Papiloma Virus*

GRP – *Gastrin-Releasing Peptide*

BB – Peptídeo Anfíbio Bombesina

GRPR ou BB2 – *Gastrin-Releasing Peptide Receptor*

P16 - Inibidor de quinase dependente de ciclina, CK12A

HNSCC - *Head and neck Squamous Cell Carcinoma*

OPSCC - *Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*

SCC - *Squamous Cell Carcinoma*

RNA_m- Ácido Ribonucleico mensageiro

ORFs- *Open Reading Frames*

Rb – *Retinoblastoma gene*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

ISH - Hibridização in situ

IHC- Imuno-histoquímica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

TMA- *Tissue MicroArray*

ASCUS - células escamosas atípicas de significado indeterminado

NIC- Neoplasia intraepitelial cervical

CDK4- Ciclina dependente de quinase 4

CDK6 – Ciclina dependente de quinase 6

P53 – Proteína supressora tumoral P53

E2F – Grupo de genes e proteínas da família dos fatores de transcrição

E2- Proteínas regulatórias do genoma do HPV

E6- Oncoproteínas do HPV

E7- Oncoproteínas do HPV

EGFR- Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

TGF- α - Fator de Transformação de Crescimento Alpha

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações	13
2.2. Marco conceitual e epidemiologia	13
2.3. Câncer de cabeça e pescoço	14
2.4. Câncer de cabeça e pescoço e o tratamento	15
2.5. Câncer de esôfago e tratamento	15
2.6. Câncer de cabeça e pescoço/esôfago associado ao GRPR	16
2.7. Biologia da infecção por papiloma vírus humano – HPV	18
2.8. Câncer de cabeça e pescoço/esôfago associado ao HPV	20
3. JUSTIFICATIVA	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo Geral	22
4.2 Objetivos Específicos	22
5. REFERÊNCIAS	23
6. ARTIGO	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	43
8. ANEXO	44

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), dentro de duas décadas, o câncer será a principal causa de morte no planeta, tanto em países desenvolvidos como os em desenvolvimento.

O câncer da região da cabeça e pescoço compreende as sublocalizações anatômicas da cavidade oral, faringe, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, laringe, cavidade nasal, seios paranasais e glândulas salivares e possuem características distintas em relação a epidemiologia, etiologia e prognóstico tumorais (Sturgis & Cinciripine, 2007).

Os tumores de cabeça e pescoço representam o nono tipo de câncer mais comum no mundo, com maior prevalência nos países em desenvolvimento, perfazendo um total de aproximadamente 700 mil novos casos anualmente. No Brasil, segundo o INCA, estima-se para 2017 que 22 mil brasileiros receberão o diagnóstico dos dois tipos mais comum de câncer na região, que são cavidade oral e laringe.

Quanto ao câncer do esôfago, no Brasil, é o 6º tipo de câncer mais frequente entre os homens e o 13º entre as mulheres, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Para o câncer de esôfago a estimativa de novos casos é de cerca de 11.000 casos novos. Na Região Sul do Brasil, o câncer de esôfago ocupa a quinta posição dentre as neoplasias mais incidentes, seguidos pelo câncer da cavidade oral e de laringe, (INCA, 2017).

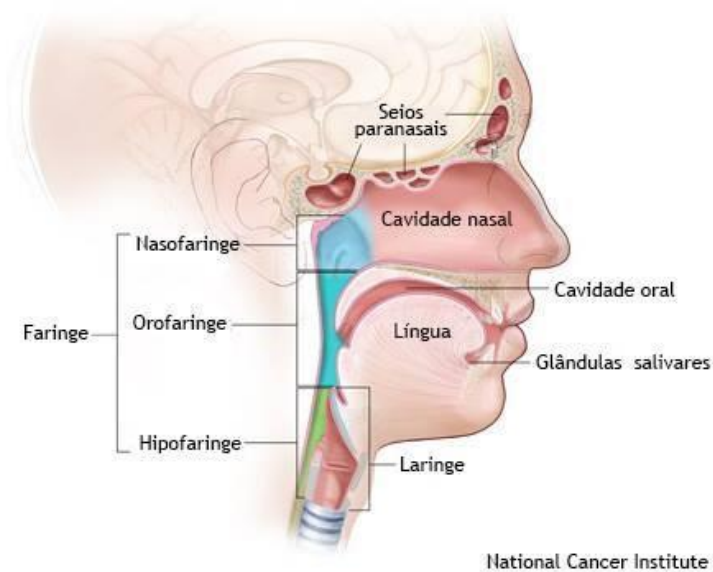


Figura 1 Regiões anatômicas acometidas pelo câncer de cabeça e pescoço.
(Adaptado do *National Cancer Institute*,2017)

Classicamente, os fatores causais mais importantes para essas neoplasias são o álcool e o tabaco (Syrjanen S, 2005). Mais recentemente, observou-se uma relação entre a infecção por subtipos oncogênicos do papiloma vírus humano (HPV, *Human Papillomavirus*) em alguns tipos de câncer de cabeça e pescoço e também no câncer de esôfago (Wang J, *et al.*, 2016). Tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da presença de HPV em tumores do epitélio escamoso. Embora, ainda não exista um consenso estabelecido para esta aplicação (Abreu PM, 2015).

Cerca de 70% dos cânceres de orofaringe (região central da garganta, incluindo o palato mole, a base da língua e as amígdalas) são causados pelo HPV. Nos Estados Unidos, mais da metade dos cânceres de orofaringe diagnosticados estão relacionados com HPV do tipo 16. No entanto, é relacionado o fato de pacientes positivos para HPV apresentarem uma melhora na sobrevida comparado com pacientes HPV negativos (Chaturvedi AK, *et al.*, 2011).

O HPV é subdividido em outros dois grupos de acordo com o risco para desenvolvimento de neoplasia denominados como baixo risco e alto risco. Os de baixo risco estão associados ao câncer, mas podem causar verrugas em diferentes regiões do corpo, como por exemplo, o HPV 6 e o HPV 11 que são

os responsáveis por causar 90% das verrugas nas genitais. Já aqueles pertencentes ao grupo de alto-risco são os que apresentam potencial oncogênico, ou seja, causam câncer. Neste último caso vários tipos de HPV foram identificados, como o HPV 16 e o HPV 18 (Lowy DR, *et al.*, 2012).

As células neoplásicas apresentam um conjunto de características heterogêneas incluindo a divisão celular descontrolada, expansão clonal, e metástases. Os receptores do fator de crescimento, normalmente apresentam expressão anormal e desregulada na superfície celular e no citoplasma das células tumorais e, por isso, estão associados ao desenvolvimento do tumor, progressão, angiogênese e metástase (Begum AA, *et al.*, 2016).

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) é um análogo mamífero do peptídeo anfíbio bombesina (BB) que estimula a proliferação celular, atuando como um fator de crescimento e, conseqüentemente, atuando na patogênese de muitos tipos de câncer. Os peptídeos BB e o GRP desempenham suas funções por meio da ligação no receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR, *gastrin-releasing peptide receptor*), um membro da superfamília dos receptores de membrana acoplados à proteína G (Roesler R, *et al.*, 2007). O GRPR e seu ligante GRP estão relacionados com a percepção da dor, regulação gastrointestinal e quimioatração, bem como a proliferação tumoral (Jensen RT, *et al.*, 2008).

A expressão de GRPR já foi avaliada em vários tipos tumorais, incluindo câncer de próstata, mama, ovário, pulmão, cabeça e pescoço, gástrico, do cólon, cânceres renais, esofágicos e gliomas (Cornélio DB, *et al.*, 2012b). Foi demonstrado a presença de níveis elevados de GRPR na mucosa bucal de pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço (Egloff AM, *et al.*, 2013). Além disso, Cornélio e colaboradores (2012a) relataram que a ativação de GRPR estimula a proliferação de células cancerígenas. Portanto, neste contexto é oportuno avaliar a expressão das proteínas GRPR e p16 em câncer de cabeça e pescoço e de esôfago e investigar a ocorrência de uma potencial relação entre estas vias de sinalização.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados à Papiloma Vírus Humano (HPV), Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR), em relação ao câncer de cabeça e pescoço e câncer de esôfago. A estratégia de busca envolveu as bases de dados SciELO e PubMed no período de 2000 a 2017 e banco de dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Foram realizadas buscas através dos termos: “Human Papillomavirus HPV”; “Head and Neck cancer”, “Esophageal cancer”, “Gastrin-Releasing Peptide Receptor GRPR”, HPV and Head and Neck cancer, “HPV and Esophageal cancer”, “GRPR and Head and Neck cancer”, “GRPR and Esophageal cancer”.

2.2 Marco conceitual e epidemiologia

O câncer de cabeça e pescoço têm o seu diagnóstico localizado, principalmente, em regiões da na cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe tendo o carcinoma de células escamosas como histologia predominante (Sturgis & Cinciripine, 2007). Mais de 500 mil novos casos são diagnosticados anualmente, tornando-se o sexto câncer mais comum em todo o mundo. Para o continente europeu e para 2012, 140.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço e 63.500 mortes em decorrência desse tipo tumoral, o que representa cerca de 4% de todos os tipos de cânceres incidentes na Europa (INCA, 2017).

O consumo de álcool, o tabagismo e a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) são fatores de risco já estabelecidos (Kawakita & Matsuo, 2017). Além disso, outro fator importante associado a este tipo de neoplasia é o sexo, uma vez que homens têm um risco quatro vezes maior de desenvolver esse tipo de câncer em relação às mulheres (Gatta G, *et al.*, 2015). Porém, a taxa de sobrevivência relativa em 5 anos varia muito de acordo com a região do tumor, local e a distância (se houve metástase ou não), em média tem uma sobrevida de 56% a 60%, segundo a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*).

Atualmente, nos Estados Unidos 25% de todos os cânceres de cabeça e pescoço diagnosticados são independentes do uso do tabaco. Sabe-se que a infecção sexualmente transmissível causada pelo HPV é o principal fator de risco para este subconjunto de tipos de câncer e que está previsto o seu envolvimento bastante específico na orofaringe. Até o ano de 2020, o número anual de casos de câncer de orofaringe causados pelo HPV está projetado para superar os casos de câncer cervical causados pelo mesmo vírus nos Estados Unidos. Assim, o aparecimento de câncer de orofaringe causado pelo HPV pode ser considerado uma epidemia de nosso tempo (Lewis A, *et al.*, 2015).

Uma das neoplasias mais graves do trato gastrointestinal é o câncer de esôfago. A taxa de incidência de câncer de esôfago varia entre diferentes grupos étnicos e regiões geográficas. Muitos fatores de risco, incluindo tabagismo, consumo de álcool, pobreza e infecção podem estar envolvidos no desenvolvimento deste tumor. Embora ainda não exista uma associação clara entre a infecção pelo HPV e câncer esofágico, há evidências de que a relação entre a infecção por HPV em determinadas populações de alto risco podem contribuir para o surgimento de câncer esofágico de células escamosas (Xu W, *et al.*, 2015).

2.3. Câncer de cabeça e pescoço

Dados da Academia Americana de Otorrinolaringologia (*American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery*), incluem câncer de laringe, garganta, lábios, boca, nariz e glândulas salivares, como tumores de cabeça e pescoço. Grande parte desses tumores têm sua origem nas células escamosas, que são as células, responsáveis pelo revestimento superfícies úmidas. Porém, diferentes tipos celulares podem apresentar potencial oncogênico, como é o caso das glândulas salivares. O uso de tabaco, o uso intenso de álcool e a infecção pelo HPV aumentam o risco para o surgimento destas neoplasias.

2.4. Câncer de cabeça e pescoço e o tratamento

Tratamento deste tipo de tumor depende de uma série de fatores, incluindo a localização exata do tumor, o estágio do câncer e a idade e a saúde geral do paciente. O protocolo de tratamento pode incluir cirurgia, terapia de radiação, quimioterapia, terapia direcionada ou uma combinação de tratamentos. Pesquisas recentes mostraram que os pacientes com tumores orofaríngeos positivos para o HPV têm um melhor prognóstico e também têm a possibilidade de realizar um tratamento menos agressivo (NCI, 2017).

Para tumores da cavidade oral, o tratamento pode ser cirúrgico e/ou radioterapia. Os dois métodos podem ser usados de forma isolada ou associada. Para tumores de laringe, dependendo da localização e a extensão do câncer, ele pode ser tratado com cirurgia e ou radioterapia e com quimioterapia associada à radioterapia (INCA, 2017).

2.5. Câncer de esôfago e tratamento

O câncer de esôfago é caracterizado, geralmente por dois tipos, carcinomas e adenocarcinomas. Carcinoma de células escamosas começa em células planas que alinham o esôfago. Já o adenocarcinoma tem sua origem em células que produzem e liberam muco e outros fluidos. O tabagismo e o aumento do consumo de álcool, são fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas esofágicas. Doenças pré-estabelecidas, como por exemplo, a doença de refluxo gastresofágico e o esôfago de Barrett podem aumentar o risco para adenocarcinoma esofágico (NCI, 2017). Os tratamentos utilizados são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, de forma isolada ou combinadas, de acordo com a avaliação médica (INCA, 2017). Por causa das semelhanças histológicas entre a cabeça e o epitélio escamoso do pescoço e o esôfago sugerem associação e características clínicas semelhantes (Guo L, *et al.*, 2016).

2.6. Câncer de cabeça e pescoço/esôfago associado ao GRPR

Existe uma crescente evidência que indica que os receptores de neuropeptídeos e os seus ligantes podem ser super expressos em células cancerosas e estão envolvidos na sobrevivência celular e crescimento. Esses receptores, incluem o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR). A expressão de GRPR já foi avaliada em vários tipos tumorais, incluindo cânceres de próstata, mama, ovário, pulmão, cabeça e pescoço, gástrico, do cólon, cânceres renais, esofágicos e gliomas (Cornélio DB, *et al.*, 2012b).

A ativação de GRPR tem sido relacionada com o estímulo à proliferação de células cancerígenas, e corroborando a isso, o uso de antagonistas de GRPR reduziram o crescimento do tumoral em modelos experimentais de câncer (Cornélio DB, *et al.*, 2012a).

O GRPR é um receptor acoplado à proteína G com sete domínios transmembranas. Ele é amplamente expresso nos sistemas nervoso central e entérico, onde atua na regulação de uma série de processos fisiológicos normais, incluindo saciedade, termorregulação, ritmo circadiano, contração muscular lisa, função imune e liberação de outros hormônios peptídicos (Fang MZ, *et al.*, 2004).

O complexo GRPR é ativado na presença de agonistas e assim, internalizado rapidamente, o que provoca dessensibilização aguda do receptor. A exposição prolongada com o agonista causa dessensibilização crônica e *downregulation* da sua expressão. A ativação de GRPR afeta não somente o crescimento dos tecidos normais como também daqueles neoplásicos (Mansi R, *et al.*, 2013).

Já se sabe, que a sinalização de GRPR parece mediar a lesão relacionada ao tabaco nos pulmões e o crescimento autócrino de carcinomas de pulmão (Tabassian AR, *et al.*, 1989). Embora a exposição ao tabaco seja um fator de risco bem caracterizado para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, Lango e colaboradores (2002), observaram que os níveis de RNA mensageiro (RNAm) de GRPR no câncer de

cabeça e pescoço primário, estavam associados com a diminuição da sobrevivência.

Os níveis elevados da expressão de GRPR também foram detectados em biópsias de pacientes com câncer de cabeça e pescoço de células escamosas (*Head and neck Squamous Cell Carcinoma - HNSCC*) e também em mucosa histológica normal desses mesmos pacientes em comparação com níveis na mucosa de pacientes controle - sem câncer. O tratamento de células de HNSCC com um anticorpo monoclonal, antagonista e seletivo GRPR, resultou em inibição do crescimento tanto *in vitro* como *in vivo*. Assim, os níveis de expressão do GRPR no HNSCC de tumor primário foram associados a metástases nodais e invasão extra capsular, demonstrando que os níveis elevados de GRPR podem estar associados com a progressão tumoral (Lui VWY, *et al.*, 2003).

Foi observado que as expressões GRPR em câncer de cabeça e pescoço pode estar relacionada a uma interação entre diversas vias de sinalização em câncer, e que, a estimulação de GRPR induz ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR- *Epidermal Growth Factor Receptor*) e secreta Fator de transformação de crescimento alpha (TGF- α - *Alpha Tumor Growth Factor*) resultando na proliferação e invasão celular tumorais (Seethala RR, *et al.*, 2008). Os tumores de locais distintos incluindo orofaringe, hipofaringe e laringe tem níveis elevados de GRPR comparando com tumores da cavidade bucal (Lango MN, *et al.*, 2002).

Em câncer de esôfago as células predominantes são as células escamosas, e em um estudo de Fang e colaboradores (2004) foi observado, nesse tipo tumoral, níveis elevados de GRPR, estabelecendo assim uma possível correlação entre a carcinogênese escamosa esofágica em estágio inicial com o GRPR. Outro estudo, porém, envolvendo câncer cervical mostrou a atuação do GRPR como um marcador eficaz de lesão para câncer uterino bem como a proteína supressora tumoral denominada "p16", utilizando o exame ginecológico de citologia cervical, conhecido como Papanicolau, como padrão para comparação deste teste (Cornélio DB, *et al.*, 2012b). O biomarcador foi fortemente associado com displasia cervical e câncer invasivo.

Além disso, a expressão de GRPR por imunocitoquímica mostrou uma alta acurácia na detecção de lesões pré-cancerígenas entre os exames de Papanicolau classificados como células escamosas atípicas de significado indeterminado–(ASCUS). Com base nesses resultados, a expressão por imunocitoquímica para GRPR pode ser considerada como um teste importante para o início detecção de neoplasia intraepitelial cervical-(NIC) (Cornélio DB, *et al.*, 2012b). Assim, gostaríamos de verificar se existe esta relação com p16 e GRPR em cânceres de cabeça e pescoço e esofágicos.

2.7. Biologia da infecção por papiloma vírus humano – HPV

Os papilomas vírus fazem parte da família *Papillomaviridae* e são vírus pequenos, não desenvolvidos com 55 nm de diâmetro e muito resistentes. Uma molécula circular de DNA de cadeia dupla de cerca de 8,000 pares de bases de nucleotídeos que contém 7 a 9 *Open Reading Frames (ORFs)*. O DNA viral está associado a histonas celulares para formar um "mini cromossoma" e está acomodado em uma cápside icosaédrica constituída por 72 capsômeros (Lazarczyk M, *et al.*,2009).

Atualmente, para compreender melhor a transformação maligna induzida por HPV, no epitélio de tumores de cabeça e pescoço, existe uma relação da sua interação com componentes-chaves do gene supressor de retinoblastoma (Rb). O gene supressor tumoral p16 é um membro da classe INK4 de inibidores do ciclo celular e representa um componente-chave da via Rb. A ligação do produto do gene supressor tumoral p16 com as cinases dependentes de ciclina 4 e 6 bloqueia sua interação com as ciclinas do tipo D, mantém o gene do retinoblastoma (Rb) em um estado hipofosforilado que se liga ao fator de transcrição de E2F e, por sua vez, impede progressão do ciclo celular. A integração de HPV resulta na deleção do gene promotor E2 viral causando transcrição de E6 e E7. A ligação da oncoproteína E7 à proteína Rb leva à degradação da proteína Rb e, assim, à superexpressão compensatória da proteína citoplasmática e nuclear p16 em células tumorais infectadas com HPV (Westra WH, 2012, Westra WH, 2014, Lewis A, *et al.*, 2015).

A proteína p16 regula Rb agindo como um inibidor das cinases dependentes de ciclina que fosforilam Rb, permitindo assim que a família E2F de fatores de transcrição inicie a expressão de genes envolvidos na entrada no ciclo celular. Em um importante loop de feedback, E2F super expressa a proteína p16ink4a, que inativa o complexo ciclina D1 / CDK4/6. Com CDK4/6 inativado, Rb é desfosforilado por fosfatases ubíquas e re-sequestrando E2F, evitando a entrada do ciclo celular (Ruhul Amin ARM, *et al.*,2015).

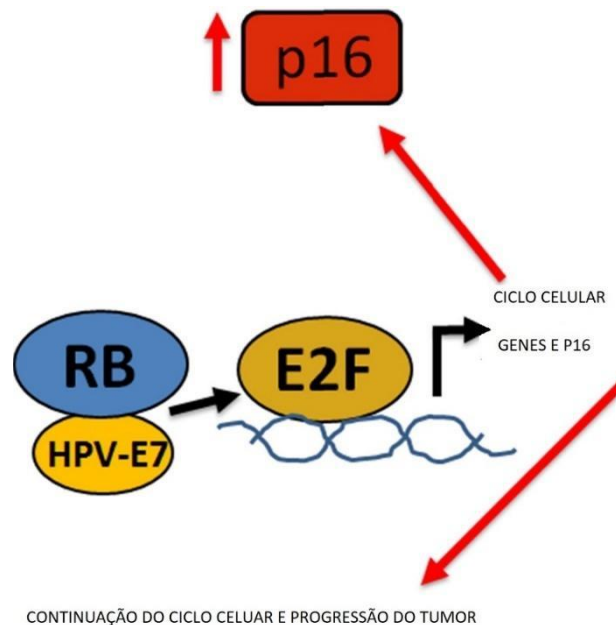


Figura 2: HPV-E7 liga-se a Rb bloqueando-o, assim também inativando E2F. Acontecendo uma super expressão do E2F e os genes do ciclo celular, p16 tornando-se um marcador para câncer induzido por HPV. (Adaptado Ruhul Amin ARM, *et al.*, 2015).

Compreendendo os mecanismos de modificação do ciclo celular promovidos pelo HPV, tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da presença de HPV em tumores do epitélio escamoso. Embora ainda não exista um consenso estabelecido para esta aplicação e alguns estudos têm mostrado não existir uma correlação absoluta entre o p16 ser um bom marcador para o HPV (Abreu PM, 2015).

2.8. Câncer de cabeça e pescoço/esôfago associado ao HPV

Papiloma vírus humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns através de um contato direto, do sexo vaginal e / ou oro-anal (Masrour-Roudsari & Ebrahimpour, 2017). Existem mais de 200 tipos de HPV, 40 são responsáveis pela infecção da mucosa oro-anal e genital, nove entre esses tipos são considerados oncogênicas (Laskar & Swain, 2015). Infecções de alto risco por HPV foram identificadas como a causa de alguns tipos de câncer, incluindo o colo do útero, região anogenital, cabeça e pescoço (Ciapponi A, *et al.*,2011, Stelzer MK, *et al.*,2010).

Infecções de alto risco e seu potencial maligno são atribuídos à função de duas oncoproteínas, E6 e E7, que desregulam o controle do ciclo celular através dos seus efeitos nos genes supressores de tumorais p53 e Rb (Fakhry & Gillison, 2006). A prevalência de HPV de alto risco foi de 89,7% no câncer cervical (Sanjose S, *et al.*, 2007), 29,5% no câncer de cabeça e pescoço (Ndiaye C, *et al.*, 2014) e 22,2% câncer de esôfago (Li X, *et al.*,2014).

Rintala e colaboradores (2006) demonstraram que homens com parceiras diagnosticadas com câncer de colo de útero ou história de câncer cervical, possuem maior risco de desenvolver câncer bucal. Outro estudo sugeriu que os maridos de mulheres com câncer cervical têm o dobro do risco de desenvolver câncer de amígdalas (Hemminki K, *et al.*,2000).

Atualmente o câncer de cabeça e pescoço associado ao HPV é relatada como uma epidemia emergente, constituindo como causas principais a presença de relações sexuais desprotegidas, múltiplos parceiros sexuais ou praticar sexo oral-anal (Shah A, *et al.*,2017).

Assim como pode ser detectada a infecção pelo HPV em cânceres como o da cavidade oral, amígdalas e faringe, ela também está presente em tumor de esôfago, devido às semelhanças histológicas entre a cabeça e o epitélio escamoso do pescoço e do esôfago sugere-se associação do vírus com esses tipos tumorais e resultando, conseqüentemente em características clínicas semelhantes. O valor prognóstico do HPV já foi investigado em pacientes com

câncer de esôfago, no entanto, os resultados ainda permanecem muito controversos (Guo L, *et al.*, 2016).

Técnicas de diagnóstico molecular têm sido utilizadas para fornecer um diagnóstico preciso e definitivo de infecção por HPV. Os métodos mais utilizados incluem reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *in situ* (ISH) e método imuno-histoquímico (IHC) com a finalidade de avaliar níveis de expressão da proteína p16 (Nowińska K, *et al.*, 2017).

A detecção do DNA viral do HPV associado ao acúmulo de p16 por imunohistoquímica no tecido tumoral é frequentemente considerado como indicativo de HPV funcionalmente ativo nos tipos tumorais avaliados (Abreu PM, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que a expressão de GRPR tem sido sugerida como um potencial marcador para displasia cervical e câncer invasivo; que a expressão de p16 tem sido também associada à infecção pelo HPV; e que níveis elevados de GRPR tem sido observados em amostras de câncer de cabeça e pescoço e câncer de esôfago, **parece-nos pertinente estudar** a potencial relação entre as expressões de GRPR e p16 em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e esôfago.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar a expressão de GRPR e p16 em biópsias de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e de esôfago.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1. Avaliar a expressão de p16 por imuno-histoquímica em câncer de cabeça e pescoço e de esôfago.

4.2.2. Avaliar a expressão do GRPR por imuno-histoquímica em câncer de cabeça e pescoço e de esôfago.

4.2.3. Correlacionar os achados de p16 e GRPR com dados clínicos dos pacientes, tais como sexo, idade, tabagismo, alcoolismo, histologia do câncer e morte.

4.2.4. Avaliar a correlação entre as expressões de p16 e GRPR nas amostras.

5. REFERÊNCIAS

Instituto Nacional do Câncer - INCA (organização governamental).2017.
<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>

International Agency for Research on Cancer- IARC. 2015. A review of human carcinogens: biological agents / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 100 B.

World Cancer Report 2014. 2015. Geneva, Switzerland: *World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*.

Sturgis, M.E., Cinciripini, M.P. 2007. Trends in Head and Neck Cancer Incidence in Relation to Smoking Prevalence. *American Cancer Society* 110:1429–35.

National Cancer Institute – NCI (a government organization).2017.
<https://www.acscan.org/>

S. Syrjanen. 2005. *Journal of Clinical Virology* 32S: S59–S66.

Wang J, Zhao L, Yan H, Che J, Huihui L, Jun W, et al. 2016. A Meta-Analysis and Systematic Review on the Association between Human Papillomavirus (Types 16 and 18) Infection and Esophageal Cancer Worldwide. *PLoS ONE* 11(7):0159140.

Anil K. Chaturvedi, Eric A. Engels, Ruth M. Pfeiffer, Brenda Y. Hernandez, et al. 2011. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *J Clin Oncol* 29:4294-4301.

Douglas R. Lowy and John T. Schiller. 2012. Reducing HPV-Associated Cancer Globally. *Cancer Prev Res* 5(1): 18–23.

Anjuman Ara Begum, Peter M. Moyle, Istvan Toth. 2016. Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24:5834–5841.

R. Roesler, F. Kapczinski, J. Quevedo, et al. 2007. The Gastrin-Releasing Peptide Receptor as a therapeutic target in Central Nervous System Disorders. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2:125-129.

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. 2008. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60:1–42.

Egloff, A.M., Liu, X., Davis, A.L.G., Trevelline, B.K, Vuga, M., Siegfried.J.M., Grandis, J.R. 2013. Elevated gastrin-releasing peptide receptor mRNA expression in buccal mucosa: association with head and neck squamous cell carcinoma. *Wiley Periodicals* 35(2): 270–279.

Cornelio, D.B., Farias, C.B., Prusch, D.S., Heinen, T.E., et al. 2012a. Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells. *Molecular and clinical oncology* 1: 148-152.

Daisuke Kawakita & Keitaro Matsuo. 2017. Alcohol and head and neck câncer. *Cancer Metastasis Rev* 36: 425–434.

Gemma Gatta, Laura Botta, et al and the EUROCORE Working Group. 2015. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCORE-5 population-based study. *European Journal of Cancer* 51: 2130– 2143.

American Cancer Society .2017. <https://www.cancer.org/>

Lewis, A., Kang, R., Levine, A., Maghami, E. 2015. The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. *Cancer Network* 2-13.

Xu W. · Liu Z. · Bao Q. · Qian Z. 2015. Viruses, Other Pathogenic Microorganisms and Esophageal Cancer. *Gastrointest Tumors* 2:2-13.

American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery. 2017. <http://www.entnet.org/>

Cornelio, D.B., Meuer, L., Schwartzmann, G., Roesler, R. 2012b. The Gastrin-Releasing Peptide Receptor as a Marker of Dysplastic Alterations in Cervical Epithelial Cells. *Oncology* 82:90–97.

Ming Zhu Fang, Changgong Liu, Yunlong Song, et al. 2004. Over-expression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 25: 865—871.

Rosalba Mansi, Achim Fleischmann, Helmut R. Mäcke and Jean C. Reubi. 2013. Targeting GRPR in urological cancers—from basic research to clinical application. *Nature Reviews Urology* 10:235-244.

Ali R. Tabassian, Eric S. Nylen, R. Ilona Linnoila, et al. 1989. *AM REV RESPIR DIS* 140:436-440.

Maciej Lazarczyk, Patricia Cassonnet, et al. 2009. The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 348–370.

Christine H. Chung, Maura L. Gillison. 2009. Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Its Role in Pathogenesis and Clinical Implications. *Clin Cancer Res* 15(22): 6758-6762.

William H. Westra. 2012. The Morphologic Profile of HPV-Related Head and Neck Squamous Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Clinical Management. *Head and Neck Pathol* 6: S48–S54.

William H. Westra. 2014. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncology* 1-9.

A.R.M. Ruhul Amin, Phillip A. Karpowicz, Thomas E. Carey, et al. 2015. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology* 35: S55–S77.

Priscila Marinho de Abreu. 2015. Hpv e expressão de p16 como biomarcadores de prognóstico em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal. *Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo*.1-56.

Miriam N. Lango, Kevin F. Dyer, Vivian Wai Yan Lui, et al. 2002. Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Mediated Autocrine Growth in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 375-383.

Vivian Wai Yan Lui, Sufi Mary Thomas, Qing Zhang, et al. 2003. Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 22, 6183–6193.

Raja R. Seethala, William E. Gooding, Phoebe N. Handler, et al. 2008. Immunohistochemical Analysis of Phosphotyrosine Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Epidermal Growth Factor Receptor Autocrine Signaling Pathways in Head and Neck Cancers and Metastatic Lymph Nodes. *Clin Cancer Res* 14:1303-1309.

Masrouf-Roudsari J, Ebrahimpour S. 2017. Causal role of infectious agents in cancer: An overview. *Caspian J Intern Med* 8(3): 153-158.

Laskar, S.G., Swain, M. 2015. HPV positive oropharyngeal cancer and treatment deintensification: How pertinent is it? *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 11(1): 6-9.

Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, et al. 2011. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 6:254-93.

Stelzer MK, Pitot HC, Liem A, et al. 2010. A mouse model for human anal cancer. *Cancer Prev Res* 3:1534–41.

Fakhry C, Gillison ML. 2006. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 24:2606–11.

de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7:453–9.

Ndiaye C, Mena M, Alemany L, et al. 2014. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15:1319–31.

Li X, Gao C, Yang Y, et al. 2014. Systematic review with meta-analysis: the association between human papillomavirus infection and esophageal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 39:270–81.

Rintala M, Grénman S, Puranen M, et al. 2006. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol* 35:89–94.

Hemminki K, Dong C, Frisch M. 2000. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 9:433–7.

Shah A, Malik A, Garg A, et al. 2017. Oral sex and human papilloma virus-related head and neck squamous cell cancer: a review of the literature. *Postgrad Med J* 1-7.

Lanwei Guo, Shuzheng Liu, Shaokai Zhang, et al. 2016. Human papillomavirus-related esophageal cancer survival A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 95:2-6.

Katarzyna Nowińska, Urszula Ciesielska, Marzenna Podhorska-Okolów, Piotr Dziegiel. 2017. The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous lesions and cancer of the larynx: A review. *Adv Clin Exp Med*. 26(3):539–547.

6. ARTIGO

EVALUATION OF p16 AND GRPR IN HEAD AND NECK AND ESOPHAGEAL CANCER

Danielly Brufatto Olguins¹, Kelly de Vargas Pinheiro¹, Camila Alves da Silva¹, Mariane da Cunha Jaeger¹, Emily Ferreira Salles Pillar³, Luis Fernando da Rosa Rivero⁵, Rafael Roesler^{1,2,4}, Caroline Brunetto de Farias^{1,4}, Gilberto Schwartzmann^{1,6}.

¹Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. ²Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. ³ Experimental Research Service -Experimental Pathology, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴ Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵ Department of Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁶ Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Periódico: Infectious Agents and Cancer

Status: A Submeter

ABSTRACT

Head and neck cancer includes lesions at nine anatomical regions such as, oral cavity, pharynx, oropharynx, hypopharynx, nasopharynx, larynx, nasal cavity, paranasal sinuses and salivary glands. The two most studied risk factors for the development of these malignancies are tobacco and alcohol. More recently, human HPV has been also recognized as a risk factor for the development of these diseases. In the case of esophageal squamous cell carcinomas, HPV was recognized as a risk factor as well. In the literature, a prevalence of high-risk HPV was observed in 89%, 29% and 22% of cases of cervical, head and neck and esophageal cancer, respectively. The gastrin-releasing factor receptor (GRPR) was shown to be expressed in a variety of human cancer types, including prostate, breast, ovary, lung, head and neck, stomach, colorectal, kidney, esophagus cancers, as well as in gliomas. High GRPR expression has been also observed in oral mucosa of patients bearing head and neck neoplasms. In experimental tumors, GRPR activation is also correlated with tumor cell growth. Considering that a potential cross-talk between HPV-p16 and GRPR signalling pathways might exist in epithelial cancer cells, this research aimed at the study of p16 and GRPR expression in tumor samples obtained from patients with histopathologically confirmed head and neck and esophageal cancers. For that purpose, the immunohistochemical method was applied. Paraffin samples of 92 patients treated at Clinical Hospital of Porto Alegre were included in this analysis. The results showed no correlation between p16 and GRPR immunohistochemistry expression. Furthermore, p16 expression was not well correlated with the presence of HPV. Notably, elevated levels of GRPR expression was documented in the tumor samples.

Keywords

Gastrin-releasing peptide receptor; Head and Neck Cancer; Esophageal Cancer; Human papillomavirus and p16.

INTRODUCTION

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the World Health Organization (WHO), cancer has long been a public health problem, even more in developing countries, in which about 20 million new cases are projected for the year 2025 [1,2].

Head and neck cancer includes lesions at nine anatomical regions such as, oral cavity, pharynx, oropharynx, hypopharynx, nasopharynx, larynx, nasal cavity, paranasal sinuses and salivary glands [3]. These tumors initiate in squamous cells, which are cells that line moist surfaces [4].

Alcohol consumption, smoking and human papillomavirus infection are established as risk factors [5]. The esophagus cancer is the same type of cells that head and neck cancer, recently was discovered that Human Papillomavirus (HPV) for this type of cancers can be a risk factor as well. [6]. More than 500,000 new cases are diagnosed annually making it the sixth most common cancer worldwide [5].

There are many evidences that neuropeptide receptors are overexpressed in various types of cancers [7]. The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is highly expressed in cancer types such as prostate, breast, ovary, lung, head and neck, gastric, colon, renal, esophageal and gliomas cancers [7,8].

The human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infections. Its transmission occurs by direct skin-to-skin contact, vaginal or oral-anal sex [9]. There are more than 200 types of HPV and about forty of them are responsible for oral and genital mucosal infection and nine of these types are considered oncogenic [10].

High-risk infections and their malignant potential are attributed to the function of two oncoproteins, E6 and E7, which deregulate cell cycle control through their effects on p53 and retinoblastoma tumor suppressor genes [11]. The prevalence of high-risk HPV was 89.7% in cervical cancer [12], 29.5% in head and neck cancer [13] and 22.2% in cancer of esophagus [14].

In this study, we investigate the relation between p16 and GRPR expression by immunohistochemistry in tumor biopsies obtained from 92 patients with head and neck or esophageal cancers treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, an academic hospital located in Southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Patient

Ninety-two paraffin blocks of tumors obtained from 44 patients with head and neck cancer (16 oral cavity and 28 larynx) and 48 esophageal cancers diagnosed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, between 2007-2011 were analysed.

Immunohistochemical technique (IHC)

The primary antibody used was a rabbit polyclonal antibody anti-GRPR (Ziel Biosciences, Brasil) or Anti-GRPR antibody (abcam 39883) or Anti-CDKN2A/p16INK4a antibody [1D7D2A1] (abcam 201980). After dewaxing, inactivating endogenous peroxidase activity and blocking cross-reaction with normal serum, 3µm sections were incubated overnight at 4°C with a diluted solution of the primary antibody (1:400) (1:50) (1:400).

Identification of the location of the primary antibody was obtained by subsequent application of secondary antibodies, and visualization of the reaction obtained with Liquid Dab (Dako, K3468) and thus slides were stained with Harris haematoxylin and differentiated into 2% ammoniacal water and dehydrated in absolute alcohol and placed in xylol for assembly of the resin blades of the Entellan type [15].

Samples showing staining in 10% to 100% of tumour cells were considered positive, samples with staining in less than 10% of tumour cells were considered negative [16].

Tissue Microarray (TMA)

For these experiments, a self-embedding TMA template, liquid paraffin placed at 65°C and five minutes to mold was applied. A heated 3mm demo punch was used. A diagram to position the blocks in the TMA and to make the inclusion of these inverted blocks was used. The first blocks were let to warm 65°C for six minutes, puncture with demo punch and place in the TMA template. TMA template were filled with liquid paraffin and left at 70°C for 8 minutes until the paraffin melted. The grill was placed on top and the temperature reduced to cool, turning the paraffin a solid block.

Statistical analysis

Results were tabulated in two columns and analyzed with Graphpad Prism Version 7.0. Non-parametric Spearman's correlation test was used to identify correlations between molecular markers. Chi-square or Fisher's exact tests were used to determine the significance of associations between categorical variables. Variables proved to be statistically significant for P-values less than 0.05.

RESULTS

Ninety-two biopsy specimens of patients with head and neck as well as esophageal cancer were analysed. Patient characteristics are summarized in Table 1. Ninety-two percent were males, 67% of them over 60 years of age. The samples comprised esophageal, larynx and oral cavity cancers in 52%, 30% and 18% of cases, respectively. The majority of patients were 60 years or older, while 22% were under 60 years old. In 44% of cases, a prior history of alcohol consumption was documented. Tobacco consumption was present in 66% of cases. In 63% of tumor samples, a moderately differentiated squamous cell carcinoma was present, while it was poorly and well differentiated tumors in

11% and 8%, respectively. Chemotherapy was part of the initial treatment in 22%

Immunohistochemistry studies using anti-CDKN2A/p16INK4a and anti-GRPR specific antibodies were applied to evaluate the level of tissue expression of both p16 and GRPR. In 32% of samples, p16 expression was considered positive, being negative in the remaining cases. In 71% of cases, GRPR expression was classified as positive, while it was negative in the other cases.

Next, we studied the potential relationship between the expression of these two proteins, showing that in p16 positive patients the percentage of GRPR positivity was 62% ($p=0.001$). When p16 expression was analysed in all 92 samples, it was significantly higher for esophageal cancer samples, as compared to oral cavity and larynx (62%, 21% and 17%, respectively; $p=0.0063$).

The above mentioned p16 positivity was higher in patients more than 60 years of age (59%), while alcohol consumption was present in 41% of cases and tobacco in 69%. When p16 expression was correlated with being alive or dead, it was observed that 76% of them were alive at the time of this analysis, which might suggest a protective effect for this patient subgroup ($p=0.0048$). Notably, tobacco consume was presente in 69% of p16 positive patients ($p=0.0150$). Notably, GRPR coexpression was shown in 62% of casos ($p=0.0001$). These results are sunmarized in Table 2.

GRPR expression was higher in esophageal cancer samples, as compared to oral cavity and larynx. It was 58%, 25% and 17% for esophageal, larynx and oral cavity tumors, respectively ($p=0.0056$). It was also more prevalent in patients more than 60 years (68%). Alcohol consupmtion was present in 44% of cases, while 60% of them were tobacco users. Most of them had not received prior chemotherapy ($p=0.0018$) and only 15% had already died. Notably, p16 negative samples comprised 72% of the samples, which almost reached statistical significance ($p= 0.0739$). These results are summarized in Table 3.

Patients showing p16 positivity comprised 32% of the studied population. Interestingly, the majority of them (62%) were GRPR positive (Figure 1). When p16 positivity was studied according to the site of origin, it was positive in 25% of head and neck and in 38% of esophageal cancers (Figure 2).

Table 1: Patients' characteristics

Variable	Category	n	%
Sex	Female	7	8%
	Male	85	92%
Tumoral type	Oral	16	18%
	Larynx	28	30%
	Esophageal	48	52%
Age	≤ 60 years old	20	22%
	> 60 years old	62	67%
	Missing	10	11%
Alcohol consumption	Yes	41	44%
	No	20	22%
	Missing	31	34%
Tobacco consumption	Yes	61	66%
	No	5	6%
	Missing	26	28%
Histological grade	Well differentiated	7	8%
	Moderately differentiated	58	63%
	Poorly differentiated	10	11%
	Missing	17	18%
Chemotherapy	Yes	20	22%
	No	50	54%
	Missing	22	24%
Death	Yes	18	20%
	No	60	65%
	Missing	40	15%
p16	Positive	29	32%
	Negative	63	68%
GRPR	Positive	65	71%
	Negative	27	29%

Table 2: Relation with p16 and Patients characteristics

Variable	Category	p16 +	p16 +	p value
		n	%	
Tumoral type	Oral	6	21%	*0.0063
	Larynx	5	17%	
	Esophageal	18	62%	
Age	≤ 60 years old	9	31%	0.0665
	> 60 years old	17	59%	
	Missing	3	10%	
Alcohol consumption	Yes	12	41%	0.662
	No	6	21%	
	Missing	11	38%	
Tobacco consumption	Yes	20	69%	*0.0150
	No	0	0%	
	Missing	9	31%	
Chemotherapy	Yes	5	17%	0.1957
	No	17	59%	
	Missing	7	24%	
Death	Yes	3	10%	*0.0048
	No	22	76%	
	Missing	4	14%	
GRPR	Positive	18	62%	*0.0001
	Negative	11	38%	

Table 3: Relation with GRPR and Patients characteristics

Variable	Category	GRPR +	GRPR +	p value
		n	%	
Tumoral type	Oral	11	17%	*0.0056
	Larynx	16	25%	
	Esophageal	38	58%	
Age	≤ 60 years old	13	20%	0.5059
	> 60 years old	44	68%	
	Missing	8	12%	
Alcohol consumption	Yes	27	41%	0.1616
	No	14	22%	
	Missing	24	37%	
Tobacco consumption	Yes	39	60%	0.1061
	No	7	11%	
	Missing	19	29%	
Chemotherapy	Yes	10	15%	*0.0018
	No	39	60%	
	Missing	16	25%	
Death	Yes	15	23%	0.0774
	No	40	62%	
	Missing	10	15%	
p16	Positive	18	28%	0.0739
	Negative	47	72%	

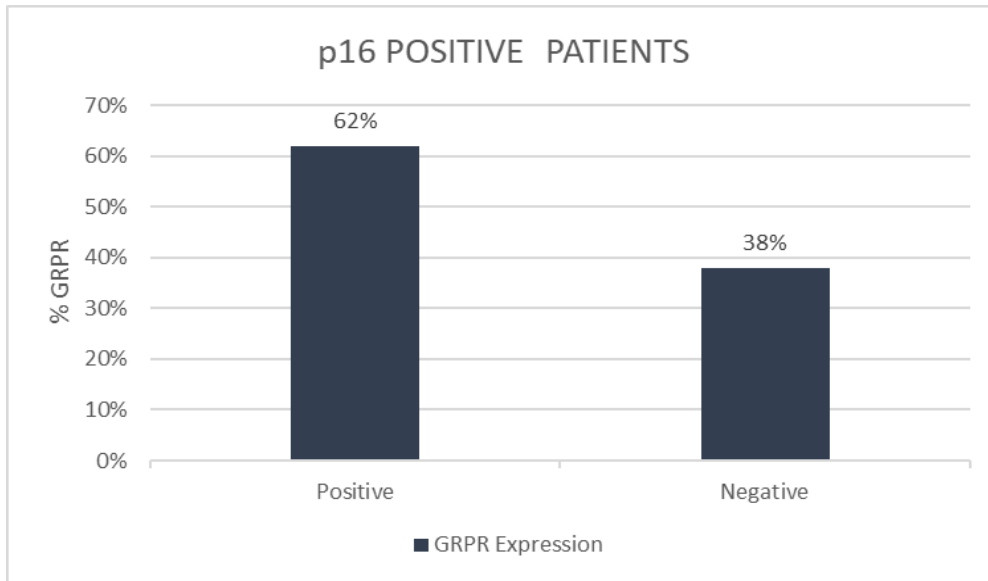


Figure 1: Relation of all p16 positive patients in relation to GRPR expression.

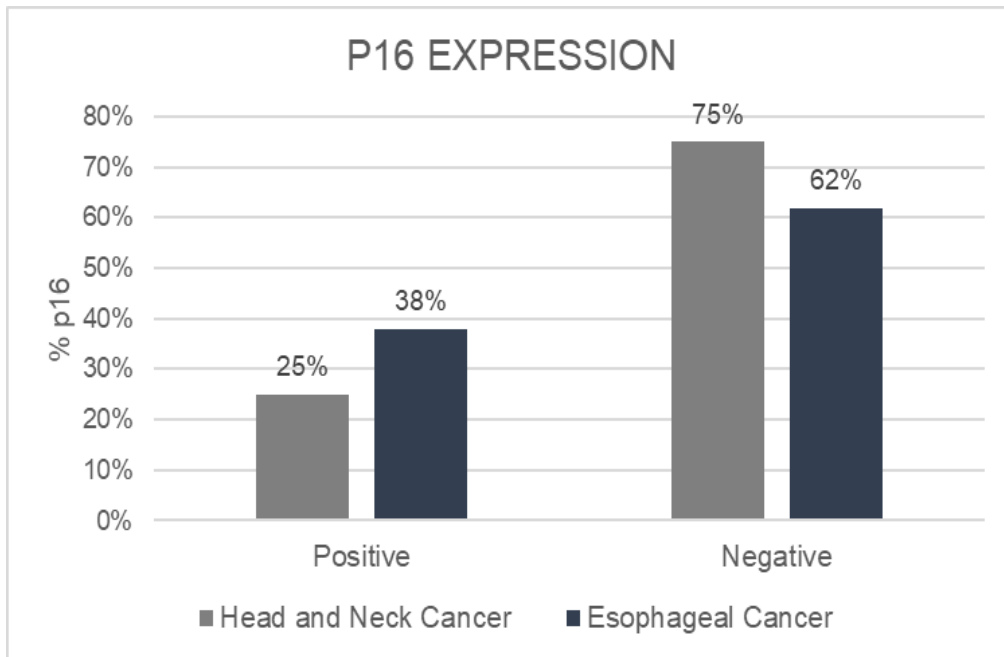


Figure 2: Expression of p16 in head and neck cancers in relation to esophageal cancer (p=0.0478).

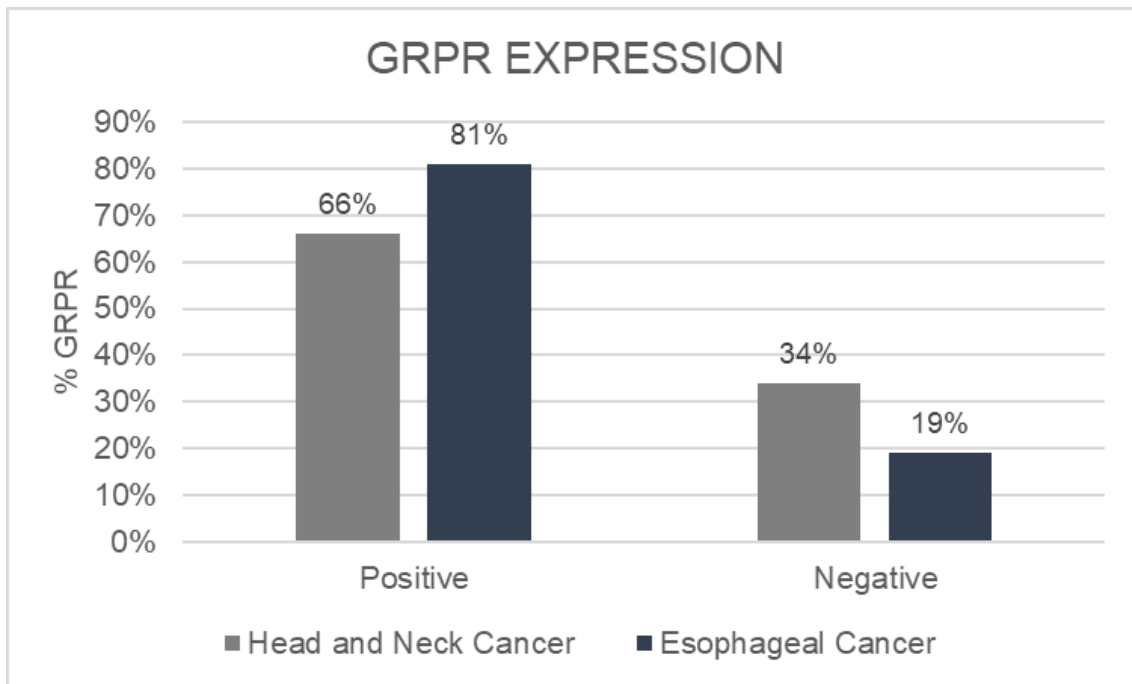


Figure 3: GRPR expression in relation to head and neck cancers and esophageal cancer ($p=0.0162$).

DISCUSSION

High-risk subtypes of the human papilloma virus (HPV) are a well-known cause of genital and anal malignancies [31]. More recently, in addition to the classic risk factors, alcohol and tobacco, high-risk HPV has been recognised as a risk factor for head and neck cancer and esophageal cancer. [25].

Most HPV-related squamous cell carcinomas have a distinct histomorphology and improved outcomes as compared to their HPV-negative counterparts. These biological differences will probably lead to changes in how these tumors will be managed in the near future [26].

The clinically favorable outcomes of these cancers are, however, limited to those that harbor transcriptionally active, high-risk HPV [27]. For head and neck primaries, in particular, that occurs predominantly in the oropharynx [29]. Therefore, detecting transcriptionally active, high-risk HPV is a very important in medical practice.

There are several HPV testing options available, but no consensus exists on which test or combination of tests is optimal for routine diagnostic use [28]. The p16 gene is often mutated in some squamous cell carcinomas, its overexpression being

caused by the viral E7 protein. Consequently, p16 is assumed to be an indirect marker of HPV-induced malignancies. Its positivity, by using the expression of p16INK4A in standard immunohistochemistry, is highly correlated with human papilloma virus (HPV) infection, but not restricted to HPV positive tumors [30].

Ndiaye and cols demonstrated that HPV DNA in about 30% of head and neck squamous cell carcinomas, being more prevalent in the oropharynx (46%), as compared to oral cavity (24%) and larynx (22%) [13]. Our results confirm the above observation. Using a anti-p16INK4A antibody to define p16 positivity, in our analysis of 92 tumor samples, of which 48, 28 and 16 were of esophageal, larynx and oral cavity origin, respectively, we were able to document a 25% positivity for head and neck and 38% for esophageal primaries.

Baboci and cols (2016) suggested that the use of p16INK4a protein alone as a marker of p16 expression has not sufficient specificity to establish causality for HPV presence in squamous cell carcinomas of the head and neck. In almost 10% of HPV negative cases, p16 positivity can be demonstrated [17].

As p16 can be expressed through distinct signaling pathways, thus having low specificity, it is now recommended that other biomarkers, such as message RNA or other means to identify HPV DNA are used as well [17,19].

In contrast to head and neck cancer series, the first meta-analysis performed in patients with esophageal cancer showed that HPV positivity was not clearly associated with a better patient outcome [18]. In our limited sample of esophageal cancers, however, there was a suggestion of the presence of a protective effect in p16 positive patients, as 76% of them were still alive at the time of analysis.

In a systematic review, in contrast with patients whose tumors arised in the oral cavity, the presence of p16 positivity did not impact the clinical outcome for patients with laryngeal primaries [19]. In our study, the number of cases of laryngeal cancers was too small to alow a firm conclusion.

The expression of gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) was shown to be increase in the mucosa adjacent to head and neck squamous cell carcinomas, as compared to mucosa from cancer-free controls [24]. By measuring GRPR mRNA levels in the oral mucosa of 65 head and neck

squamous cell carcinomas versus tumor-free controls, using quantitative polymerase chain reaction, the authors demonstrated increased GRPR expression in the tumors. GRPR expression was, however, not an indicator of better prognosis.

In another study, Lango and cols (2002) also showed higher levels of GRPR mRNA in squamous cell carcinomas of the head and neck as compared to normal mucosa ($p < 0.001$). In our study, GRPR expression was demonstrated in 66% of head and neck cases, confirming previous data. However, due to limited number of samples in our series, we were not able to correlate GRPR expression with clinical outcome.

CONCLUSION

Considering that GRPR expression was documented in the majority of tumor samples included in our study, as opposed to the low p16 positivity, we consider that further studies looking at GRPR expression as a potential tumor marker in head and neck and esophageal cancer in larger series of patients are warranted.

REFERENCES

- 1- International Agency for Research on Cancer- IARC. 2015. A review of human carcinogens: biological agents / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 100 B.
- 2-World Cancer Report 2014. 2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- 3-Sturgis, M.E., Cinciripini, M.P. 2007. Trends in Head and Neck Cancer Incidence in Relation to Smoking Prevalence.
- 4-American Cancer Society 110: American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery. 2017. <http://www.entnet.org/1429–35>.

- 5-Daisuke Kawakita & Keitaro Matsuo. 2017. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 36: 425–434.
- 6- Xu W. · Liu Z. · Bao Q. · Qian Z. 2015. Viruses, Other Pathogenic Microorganisms and Esophageal Cancer. *Gastrointest Tumors* 2:2-13.
- 7- Cornelio, D.B., Farias, C.B., Prusch, D.S., Heinen, T.E., et al. 2012a. Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells. *Molecular and clinical oncology* 1: 148-152.
- 8- Cornelio, D.B., Meuer, L., Schwartzmann, G., Roesler, R. 2012b. The Gastrin-Releasing Peptide Receptor as a Marker of Dysplastic Alterations in Cervical Epithelial Cells. *Oncology* 82:90–97.
- 9- Masrour-Roudsari J, Ebrahimpour S. 2017. Causal role of infectious agents in cancer: An overview. *Caspian J Intern Med* 8(3): 153-158.
- 10- Laskar, S.G., Swain, M. 2015. HPV positive oropharyngeal cancer and treatment deintensification: How pertinent is it? *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 11(1): 6-9.
- 11- Fakhry C, Gillison ML. 2006. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 24:2606–11.
- 12- De Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7:453–9.
- 13-Ndiaye C, Mena M, Alemany L, et al. 2014. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15:1319–31.
- 14-Li X, Gao C, Yang Y, et al. 2014. Systematic review with meta-analysis: the association between human papillomavirus infection and esophageal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 39:270–81.

- 15-Daniela Baumann Cornélio, Luise Meurer, Rafael Roesler, Gilberto Schwartzmann. 2008. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Expression in Cervical Cancer. *Oncology* 73:340–345.
- 16- Lucas-Roxburgh R, Benschop J, Lockett B, et al. 2017. The prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a New Zealand population. *PLoS ONE* 12:10.
- 17-Lorena Baboci, Dana Holzinger, Paolo Boscolo-Rizzo, Giancarlo Tirelli, et al. 2016. Low prevalence of HPV-driven head and neck squamous cell carcinoma in North-East Italy. *Papillomavirus Research* 2:133–140.
- 18- Lanwei Guo, Shuzheng Liu, Shaokai Zhang, et al. 2016. Human papillomavirus-related esophageal cancer survival A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 95:2-6.
- 19-Massimo Fusconi, Flaminia Campo, Andrea Gallo, et al. 2016. Laryngeal Cancer, HPV DNA vs E6/E7 mRNA Test: A Systematic Review. *Journal of Voice* 31:1-5.
- 20-Miriam N. Lango, Kevin F. Dyer, Vivian Wai Yan Lui, et al. 2002. Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Mediated Autocrine Growth in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 375-383.
- 21-Vivian Wai Yan Lui, Sufi Mary Thomas, Qing Zhang, et al. 2003. Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 22, 6183–6193.
- 22-Raja R. Seethala, William E. Gooding, Phoebe N. Handler, et al. 2008. Immunohistochemical Analysis of Phosphotyrosine Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Epidermal Growth Factor Receptor Autocrine Signaling Pathways in Head and Neck Cancers and Metastatic Lymph Nodes. *Clin Cancer Res* 14:1303-1309.

23- Ming Zhu Fang, Changgong Liu, Yunlong Song, et al. 2004. Over-expression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 25: 865—871.

24- Egloff, A.M., Liu, X., Davis, A.L.G., Trevelline, B.K, Vuga, M., Siegfried.J.M., Grandis, J.R. 2013. Elevated gastrin-releasing peptide receptor mRNA expression in buccal mucosa: association with head and neck squamous cell carcinoma. *Wiley Periodicals* 35(2): 270–279.

25-Syrjänen K1, Syrjänen S. 2013. Detection of human papillomavirus in esophageal papillomas: systematic review and meta-analysis. *APMIS* 121(5):363-74.

26-Gama RR, Carvalho AL, Longatto Filho A, Scorsato AP, López RV, Rautava J, Syrjänen S, Syrjänen K. 2016. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope* (4):885-93.

27-Young D, Xiao CC, Murphy B, Moore M, Fakhry C, Day TA. 2015. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol* 51(8):727-30.

28-Syrjänen S. 2010. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* 7:243-5.

29-Dalianis T. 2014. Human papillomavirus (HPV) and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Presse Med.* 12 :429-34.

30-Jelihovschi I, Bidescu AC, Tucaliuc SE, Iancu LS. 2015. DETECTION OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS: A LITERATURE REVIEW. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 119(2):502-9.

31-Ronco G, Giorgi Rossi P. 2017. Role of HPV DNA testing in modern gynaecological practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 1521-6934(17)30119-0.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que não existe uma relação direta com p16 e GRPR, mas podemos sugerir que GRPR é um melhor biomarcador para células tumorais que p16. Embora ainda, precisaremos fazer mais análises para comprovar nossos achados, como utilizarmos outros métodos para detecção do p16, não apenas o teste de imunohistoquímica.

8.ANEXO

COMPARAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTI-GRPR

Anticorpos são conhecidos como proteínas que reconhecem antígenos de maneira específica e com alto grau de afinidade (Lataro, *et al.*, 2016). O desenvolvimento de anticorpos policlonais e monoclonais por meio de animais de laboratório tornou-se uma abordagem essencial para proteger contra uma série de doenças (Marasco e Sui, 2007). Os anticorpos policlonais contêm grandes e diversas concentrações de diferentes anticorpos com especificidades desconhecidas. Eles são amplamente utilizados para a detecção de diferentes antígenos em pesquisas e diagnósticos (Wilde *et al.*, 1996).

As interações de antígenos são essenciais para as funções normais de anticorpos que são amplamente utilizados em pesquisas ou terapêuticas. A resposta do receptor de anticorpos associada ao antígeno e a membrana é mediada por células T e / ou B. Conseqüentemente, após a ligação com um antígeno adequado, os linfócitos B são induzidos a proliferar e dividem-se por uma série de sinais de ativação, aumentando assim o número de células B. Estas células B são então diferenciadas em clones de células de plasma que produzem anticorpos específicos que reconhecem epítomos de antígeno específicos através do receptor de antígeno. Os anticorpos policlonais (pAbs) podem ser produzidos rapidamente em vários meses (em comparação com anticorpos monoclonais), com baixo custo, baixa habilidade técnica, e estes são estáveis em uma ampla gama de concentrações de pH e sal (Lipman *et al.*, 2005, Saeed, *et al.*, 2017).

Além disso, esses anticorpos policlonais possuem especificidade superior em comparação com anticorpos monoclonais porque são gerados por um grande número de clones de células B, produzindo anticorpos para um epítomo específico (Hudson *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2014).

Então, para o melhor desenvolvimento deste trabalho, resolvemos comparar a eficiência de dois anticorpos: um nacional (o que é mais econômico para nossa pesquisa) e um anticorpo comercial importado já estabelecido.

Portanto, ambos os anticorpos foram testados em amostras de câncer de cabeça e pescoço e de esôfago, pelo método imunohistoquímico anteriormente descritos, considerando-se que já havia sido demonstrada uma expressão aumentada de GRPR nestes tipos de tumores.

MÉTODOS

Pacientes

Utilizou-se 92 blocos de parafina de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Realizou-se a técnica de imunohistoquímica, previamente mencionada, utilizando-se como anticorpo primário um anticorpo policlonal de coelho anti-GRPR (Ziel Biosciences, Brasil) e o anticorpo anti-GRPR comercialmente disponível (ABCAM 39883). Após a desparafinização, inativando a atividade da peroxidase endógena e bloqueando a reação cruzada com soro normal, as secções de 3µm foram incubadas durante a noite a 4°C com uma solução diluída do anticorpo primário (1: 400) (1:50). A identificação da localização do anticorpo primário foi obtida por aplicação subsequente de anticorpos secundários, e a visualização da reação foi obtida com Liquid Dab (Dako, K3468) e após as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas em água amoniacal 2% e desidratados em álcool absoluto e colocados em xilol para montagem das lâminas em resina do tipo Entellan (CORNELIO, 2008).

As amostras mostrando coloração em 10% a 100% das células tumorais foram consideradas positivas e as amostras com coloração em menos de 10% das células tumorais foram consideradas negativas (Lucas-Roxburgh R, et al., 2017).

Análise Estatística

Os resultados foram tabulados em duas colunas e analisados com Graphpad Prism Versão 7.0. O teste de correlação de Spearman não paramétrico foi utilizado para identificar correlações entre marcadores moleculares. O Qui-quadrado ou os testes exatos de Fisher foram usados para determinar o significado das associações entre variáveis categóricas. As variáveis que se mostraram valores P inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Na amostra, os resultados obtidos foram semelhantes. Observou-se com o anticorpo anti-GRPR da empresa Ziel Biosciences 74% de positividade, enquanto esta foi de 73% com o anticorpo comercial da ABCAM. Pode-se concluir que o anticorpo anti-GRPR nacional é comparável ao comercial, funcionando em melhores condições, uma vez que permitiu uma diluição 1:50 para funcionamento, enquanto o anti-GRPR da empresa Ziel foi feita uma diluição oito vezes maior, 1:400 ($p=0.7501$).

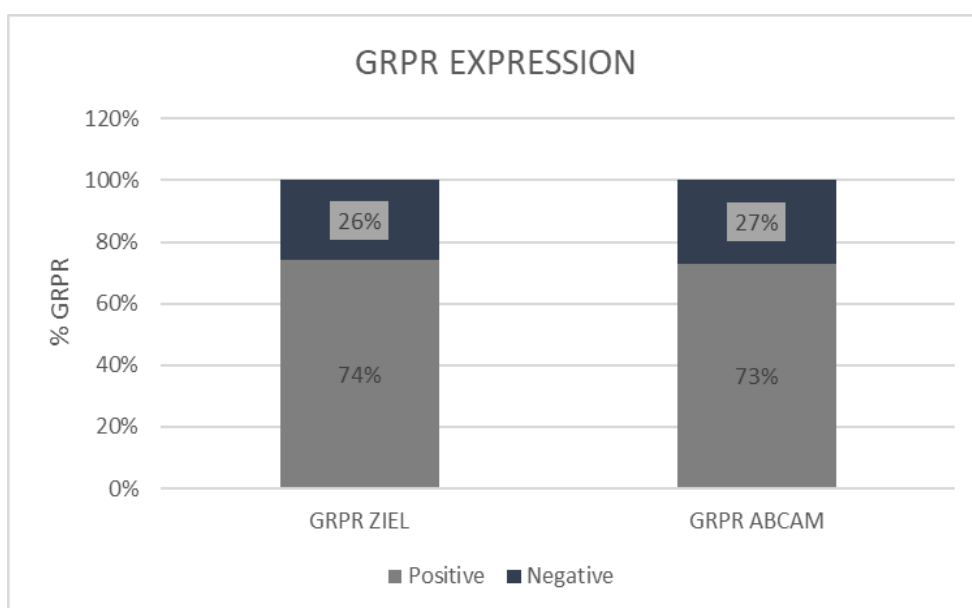


Figura 1: Gráfico demonstrando a expressão do GRPR Ziel x GRPR Abcam

Foram também avaliados 9 pacientes com tumor de cabeça e pescoço, incluindo controles negativos de tecido normal, no sentido de validar a eficácia do anticorpo da empresa Ziel em relação ao anticorpo da Abcam. Pode-se observar que ambos os anticorpos foram negativos para GRPR nos controles, confirmando a comparabilidade dos achados. Estes achados sugerem que o anticorpo nacional da empresa Ziel possa substituir, com menor custo e maior rendimento diluicional, ao anticorpo anti-GRPR disponível comercialmente, mas de custo mais elevado.

REFÊRENCIAS

Thaís Regina Brienza Lataro, Cristina Takami Kanamura, Cinthya dos Santos Cirqueira, et al. 2016. Investigation on the monoclonal antibodies as differential markers for viral and bacterial meningitis by means of immunohistochemistry technique. *Rev Inst Adolfo Lutz* 75:1696.

Wayne A Marasco & Jianhua Sui. 2007. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nature Biotechnology* 25:1421–1434.

Wilde, H., Thipkong, P., Sitprija, V., and Chaiyabutr, N. 1996. Heterologous antisera and antivenins are essential biologicals: perspectives on a worldwide crisis. *Ann. Intern. Med.* 125: 233–236.

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., and Weis-Garcia, F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 46:258–268.

Abdullah F. U. H. Saeed, Rongzhi Wang, Sumei Ling and Shihua Wang. 2017. Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Front. Microbio* 8:1-28.

Hudson, E. P., Uhlen, M., and Rockberg, J. (2012). Multiplex epitope mapping using bacterial surface display reveals both linear and conformational epitopes. *Sci. Rep.* 2:706.

Zhuang, Z. H., Que, S. J., Gao, Y. M., Yuan, J., Ye, Z., Du, M., et al. (2014). Artificial antigen synthesis and the development of polyclonal antibody-based immunoassay for citreoviridin determination. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 343–349.

Daniela Baumann Cornélio, Luise Meurer, Rafael Roesler, Gilberto Schwartzmann. 2008. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Expression in Cervical Cancer. *Oncology* 73:340–345.

Lucas-Roxburgh R, Benschop J, Lockett B, et al. 2017. The prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a New Zealand population. *PLoS ONE* 12:10

RESULTADOS OBTIDOS NO MESTRADO SANDUÍCHE DE 6 MESES NA UNIVERSITY OF NOTTINGHAM – UK

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) é um análogo mamífero do peptídeo anfíbio bombesina (BB) que estimula a proliferação celular, atuando como um fator de crescimento e, conseqüentemente, atuando na patogênese de muitos tipos de câncer. Os peptídeos BB e o GRP desempenham suas funções por meio da ligação no receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR, *gastrin-releasing peptide receptor*), um membro da superfamília dos receptores de membrana acoplados à proteína G (Roesler, *et al.*, 2007). O GRPR e seu ligante GRP estão relacionados com a percepção da dor, regulação gastrointestinal e quimioatração, bem como a proliferação tumoral (Jensen RT *et al.*, 2008). Embora este receptor tenha uma afinidade significativamente maior (aproximadamente 100 vezes) para GRP sobre o peptídeo endógeno associado neuromedina B (NMB), tanto o GRP como o NMB podem estimular a sinalização GRPR de forma eficaz (Jensen RT *et al.*, 2008). Aqui, utilizamos um novo ensaio de complementação (NanoBiT, Promega;), a NanoLuc luciferase (Nluc) é uma enzima que catalisa o substrato, a furimazina, para produzir luz, baseada no NanoLuc de luciferase de camarão modificado, para comparar o recrutamento estimulado por GRP e NMB do efetor β -arrestina2 ao GRPR. Nluc tem maior sensibilidade do que outros marcadores de bioluminescência comumente usado.

MÉTODOS

As células HEK293T transfectadas de forma estável e transientes, coexpressam os receptores de GRP marcados com a tag SNAP no terminal C ao fragmento NanoLuc de 156 aminoácidos (LgBiT) e β -arrestina2 modificado no terminal N com o peptídeo complementar SmBiT86 e/ou SmBiT114 (11 aminoácidos) e 5 GlySer. Para os ensaios NanoBiT β -arrestina2, as células foram plaqueadas em placas brancas de 96 poços e foi adicionado o substrato de furimazina (Dixon, *et al.*, 2016) em HBS / 0,1% de BSA 5 min antes do agonista durante 30 minutos a 37°C. A luminescência foi registrada usando o

equipamento BMG Pherastar2. As análises foram feitas em experimentos por triplicatas e foi utilizado o GraphPad Prisma v7.

CONCLUSÃO

A complementação baseada em NanoBiT é uma medida reversível e rápida da associação β -arrestina2 com o GRPR, mostrando que GRP e NMB ativam esta via com diferentes cinéticas.

RESULTADOS

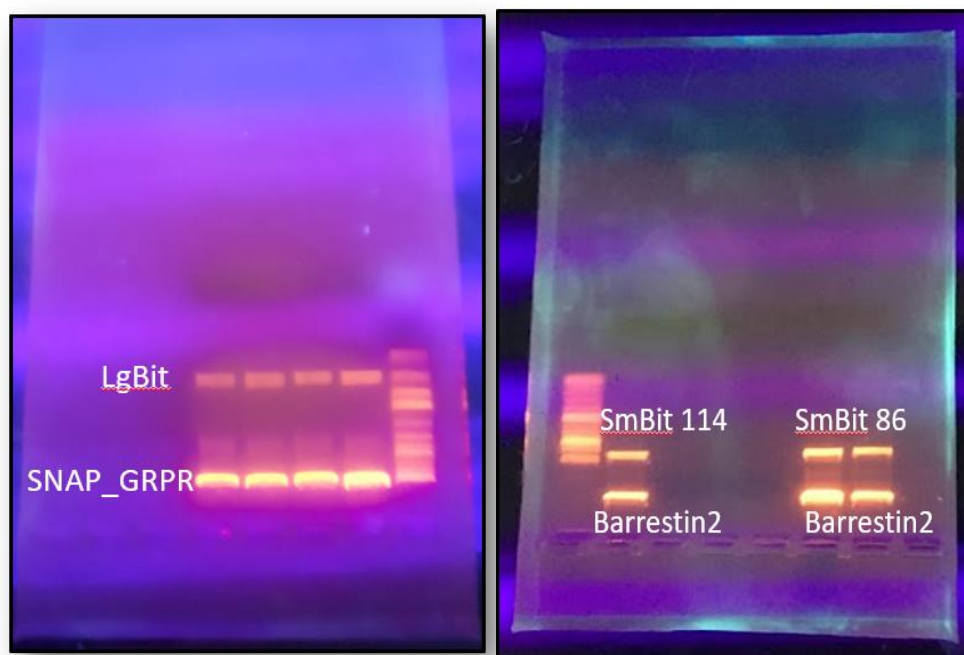


Figura 1: Resultados dos constructos LgBit, SmBit86 and SmBit114

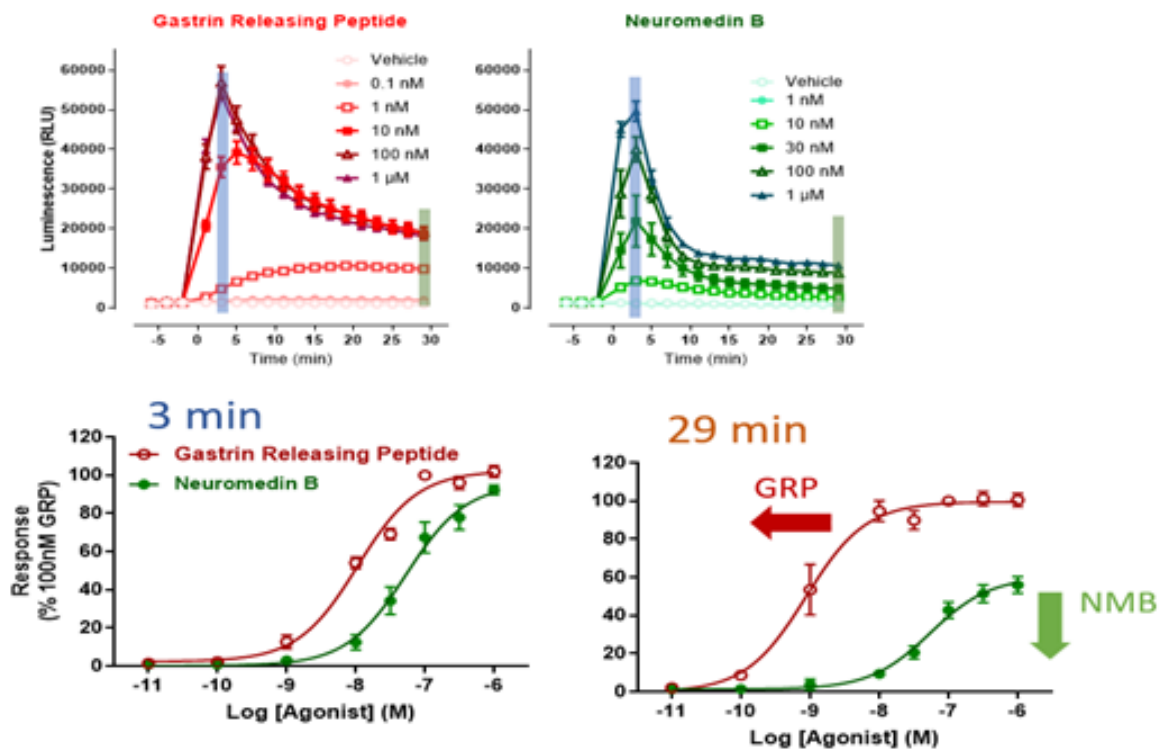
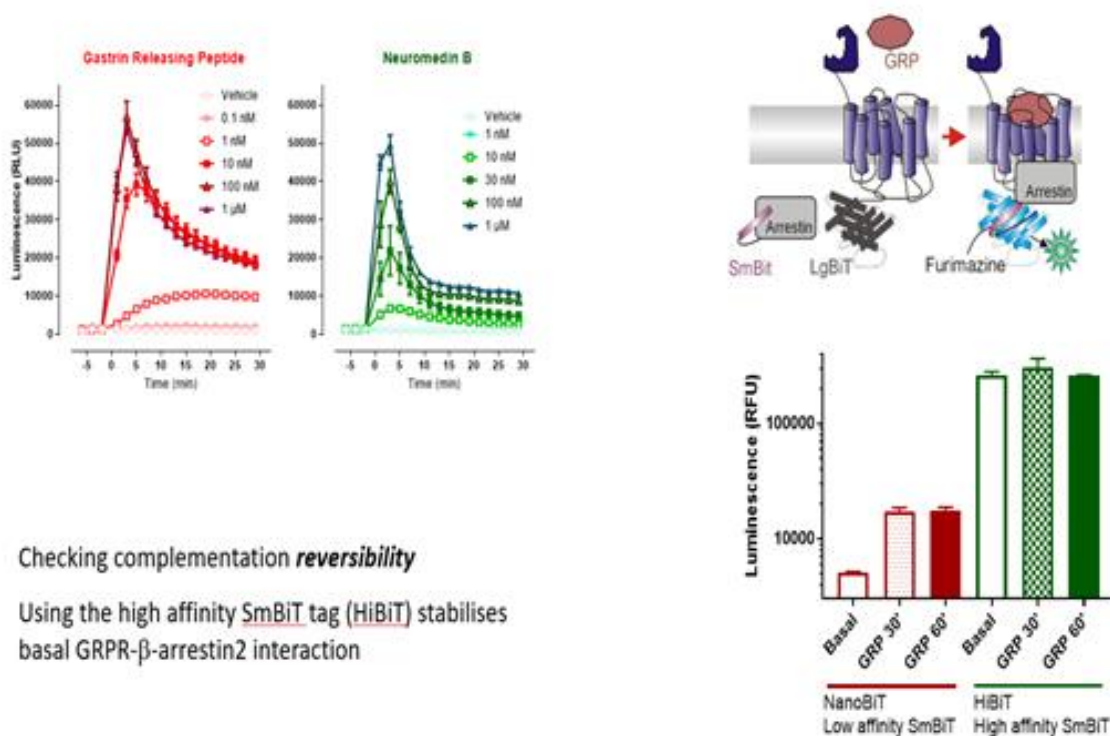


Figura 2: Resultado da cinética dos agonistas de GRPR



Checking complementation *reversibility*

Using the high affinity SmBiT tag (HiBiT) stabilises basal GRPR- β -arrestin2 interaction

Figura 3: Resultado da cinética dos agonistas de GRPR em células com transfecção transiente

Pôster apresentando no congresso *British Pharmacological Society* em dezembro de 2017:

Real time analysis of β -arrestin2 recruitment at the gastrin releasing peptide (BB2) receptor using Nanoluciferase complementation

Yasmin Felstead¹, Dani B Olguins², Liciane F Medeiros², Rafael Roesler², and Nicholas D Holliday¹

¹School of Life Sciences, University of Nottingham, Queen's Medical Centre, Nottingham NG7 2UH

²Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BRAZIL



INTRODUCTION

Gastrin releasing peptide (GRP) and its G protein coupled receptor BB2 are implicated in pain perception, gastrointestinal regulation and chemoattraction, as well as tumour proliferation¹. While this receptor is reported to have significantly higher affinity (approximately 100 fold) for GRP over the related endogenous peptide neuromedin B (NMB), both GRP and NMB may stimulate BB2 signalling effectively². Here we use a new complementation assay³ (NanoBIT, Promega), based on the modified shrimp luciferase Nanoluc, to compare GRP and NMB stimulated recruitment of the effector β -arrestin2 to the BB2 receptor.

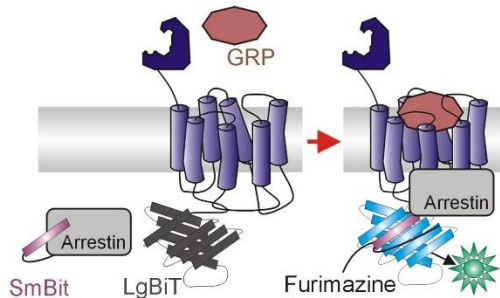


Figure 1: Principle of the NanoBIT arrestin complementation assay. The BB2 receptor, C terminally tagged with the LgBIT Nanoluc fragment, is co-expressed with β -arrestin2 modified at the N terminus with the complementary SmBIT peptide. Agonist-stimulated association of the partners reconstitutes the functional luciferase enzyme. This can be detected as a luminescent signal in the presence of the substrate furimazine.

METHODS

Molecular Biology and cell culture: The SNAP-tagged BB2 receptor cDNA was fused at the C terminus to the LgBIT Nanoluc fragment³, with an intervening 5 GlySer linker. The 11 amino acid SmBIT114 peptide [MVSQYRFLFEEL]³ was used as the N terminal tag for human β -arrestin2. Both cDNAs, in pcDNA3.1, were stably co-expressed in HEK293T cells (HEK BB2 114A2 cells), cultured as previously described³.

Calcium response measurements: BB2-LgBIT receptor stimulation of intracellular calcium was assessed by Fluo4 indicator³. Agonist additions were made on a Molecular devices Flexstation III, in HEPES buffered salt solution (HBSS; HEPES 25 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgSO₄ 1 mM, NaCl 146 mM, α -glucose 10 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 1.5 mM, and 0.1 % BSA; pH 7.4).

Arrestin complementation assays: HEK BB2 114A2 cells grown to 70 % confluence in 96 well white walled plates were loaded with furimazine substrate at 1:350 dilution (Live cell substrate, Promega)³ in HBS / 0.1 % BSA 5min prior to agonist for 30min at 37°C. Luminescence was recorded every 2 min before and after agonist additions using a BMG Pherstar2 plater reader.

Data analysis: Calcium concentration response relationships were constructed using the peak response (expressed as fold over basal, triplicate) using Graphpad Prism v7.0. Complementation assays were in duplicate or triplicate, with concentration response curves constructed from different time points as indicated; data were normalised to vehicle (0 %) and 100 nM GRP (100 %). pEC₅₀ and R_{max} values were pooled from individual experiments as mean \pm s.e.m.

RESULTS

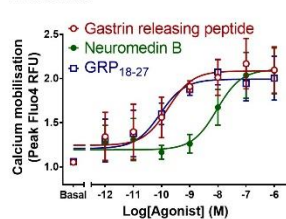


Figure 2: GRP, NMB and GRP₁₈₋₂₇ mobilise intracellular calcium in HEK BB2 114A2 cells. Pooled concentration response data are derived from peak Fluo4 fluorescence increases, expressed as fold over basal (n = 5). pEC₅₀ values were 9.29 \pm 0.06 (GRP), 8.24 \pm 0.23 (NMB), 9.84 \pm 0.23 (GRP₁₈₋₂₇).

Expected order of potency for BB2 receptors in the calcium assay: GRP = GRP₁₈₋₂₇ > NMB

ACKNOWLEDGEMENTS: We would like to thank the BPS for a summer vacation studentship to Yasmin Felstead. Supported by the Nottingham-Brazil CAPES Drug Discovery program.

REFERENCES: (1) Jensen RT et al. (2008). *Pharmacol Rev* 60:1-42. (2) Dixon AS et al. (2016). *ACS Chem Biol* 11:400-408. (3) Watson SJ et al. (2012). *Mol Pharmacol* 81:631-642.

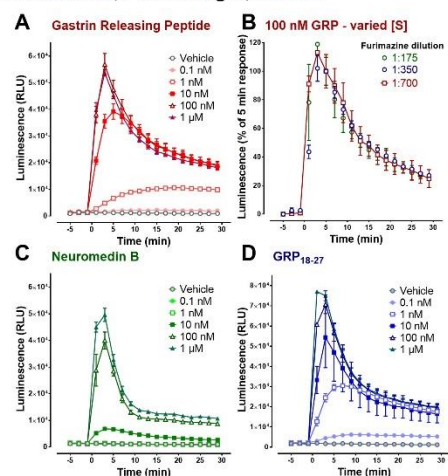


Figure 3: The NanoBIT complementation assay reports rapid BB2 receptor recruitment of β -arrestin2. HEK BB2 114A2 cells were treated with Promega live cell substrate at 1:350 dilution (or as indicated in B) for 5 min prior to agonist addition, following the read at t=1 min. Representative timecourses for GRP (A), NMB (C) and GRP₁₈₋₂₇ (D) are illustrated (single duplicate experiment, mean \pm range). In (B), GRP concentration response curves were repeated in the presence of different substrate dilutions, and 100 nM GRP data normalised to the response at 5 min in each case.

- Rapid BB2 recruitment of β -arrestin2 demonstrated by the NanoBIT assay
- GRP response kinetics are independent of furimazine concentration over range tested

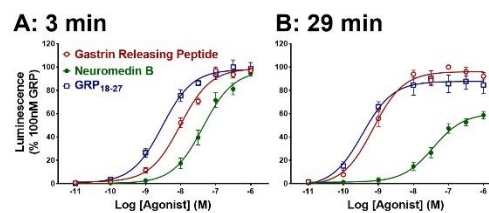


Figure 4: Kinetic dependence of agonist concentration response curves in the NanoBIT β -arrestin2 assay. Concentration response curves represent pooled data (mean \pm s.e.m., n = 5 - 15), normalised to 100 nM GRP, at the 3 min and 29 min timepoints following agonist addition. pEC₅₀ and R_{max} values are given in Table 1.

Agonist	β -arrestin2 recruitment (3 min)		β -arrestin2 recruitment (29 min)	
	pEC ₅₀	R _{max} (% 100 nM GRP)	pEC ₅₀	R _{max} (% 100 nM GRP)
GRP	8.05 \pm 0.07	119 \pm 9	9.09 \pm 0.06***	101 \pm 2
NMB	7.46 \pm 0.25	113 \pm 15	7.78 \pm 0.39	66 \pm 7*
GRP ₁₈₋₂₇	8.49 \pm 0.12	119 \pm 19	9.44 \pm 0.15***	88 \pm 8

Table 1: Summary of agonist potencies (pEC₅₀) and maximum responses (R_{max}) in the NanoBIT arrestin recruitment assay. Pooled data (mean \pm s.e.m.) are obtained from 5 - 15 experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared 29 min versus 3 min timepoint.

- BB2 receptor displays more transient kinetics of β -arrestin2 recruitment in response to NMB, compared to GRP and GRP₁₈₋₂₇
- Increased GRP and GRP₁₈₋₂₇ potency as equilibrium approached
- Partial agonism of NMB revealed at longer timepoints

CONCLUSION

NanoBIT complementation measures β -arrestin2 association with the BB2 receptor in a rapid reversible manner, and shows that GRP and NMB activate this pathway with differing kinetics.