

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

PERFIL DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE  
GASTRINA EM MATERIAIS DE BIÓPSIA DE PACIENTES PORTADORES DE  
MELANOMA MALIGNO

BIANCA FONTANA MARRONE

Porto Alegre  
2012

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

PERFIL DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE  
GASTRINA EM MATERIAIS DE BIÓPSIA DE PACIENTES PORTADORES DE  
MELANOMA MALIGNO

BIANCA FONTANA MARRONE

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre  
2012

#### CIP - Catalogação na Publicação

Marrone, Bianca  
Perfil de Expressão do Receptor do Peptídeo  
Liberador de Gastrina em Materiais de Biópsia de  
Pacientes Portadores de Melanoma Maligno / Bianca  
Marrone. -- 2012.  
68 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, 2012.

1. Medicina. 2. Oncologia. 3. Melanoma Maligno.  
4. Peptídeo Liberador de Gastrina. I. Schwartzmann,  
Gilberto, orient. II. Título.

Dedico esse trabalho à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann, por todas as oportunidades a mim proporcionadas nos últimos anos.

À Dra. Luise Meurer pelo auxílio na realização da técnica de imunohistoquímica.

Ao acadêmico de Medicina Werner Weiss Kleina pelo esforço e tempo dispensado para me auxiliar na elaboração desse trabalho.

Aos meus pais, João e Suelem, pelo exemplo de dignidade e caráter que sempre demonstraram e pelo investimento que fizeram em minha formação.

Ao meu marido Luiz Carlos, pelo amor e companheirismo dedicados a mim durante todos os anos em que convivemos.

***“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais retorna ao seu tamanho original.”***

Albert Einstein

## RESUMO

**Introdução:** A incidência de melanoma maligno (MM) está aumentando mundialmente e o manejo de pacientes com doença avançada representa um difícil problema. Durante décadas, a quimioterapia foi o tratamento padrão no tratamento de pacientes com MM metastático. Entretanto, essa modalidade tem produzido resultados desapontadores. Recentemente, com os avanços no conhecimento sobre os eventos moleculares relacionados ao desenvolvimento do MM, novas drogas dirigidas a alvos moleculares de relevância na doença têm sido identificadas. O peptídeo liberador de gastrina (GRP) é um peptídeo neuroendócrino, o qual possui efeito estimulador no crescimento em vários tipos de neoplasias murinas e humanas. Poucos dados são conhecidos em relação à expressão de receptores de GRP (GRPR) em materiais de biópsia de pacientes portadores de MM. A identificação de uma expressão elevada destes receptores no MM poderá permitir uma maior compreensão sobre a biologia desta neoplasia, bem como embasar estudos com o uso de moduladores desta via de sinalização com potencial ação terapêutica.

**Objetivos:** O objetivo desse estudo foi determinar a expressão de receptores de GRP em biópsias de pacientes com MM, bem como buscar eventuais correlações entre os níveis de expressão de GRPR e fatores prognósticos reconhecidos nesta doença.

**Métodos:** Foi realizado um estudo imuno-histoquímico (IHQ) em blocos fixados em formalina e embebidos em parafina, contendo material de biópsia de 51 pacientes portadores de MM cutâneo. Utilizou-se um anticorpo policlonal de coelho anti-GRPR (OPA1-15619, Affinity Bioreagents, USA). Após a quantificação da expressão de

GRPR nas amostras, foram analisadas as diferenças de expressão entre subgrupos prognósticos, com a aplicação do teste exato de Fisher.

**Resultados:** A expressão de GRPR foi demonstrada no citoplasma de 42 das 51 (82,4%) amostras de MM cutâneo. A expressão foi considerada forte em 30 amostras (58,9%). Não foi observada diferença significativa na expressão de GRPR quando foram analisadas amostras de MM em sítio primário versus metastático. Foram correlacionados os escores da expressão de GRPR com os achados patológicos associados ao prognóstico do MM cutâneo primário, não tendo sido detectadas diferenças significativas com relação aos níveis de Clark ( $p=0,35$ ) e Índice espessura de Breslow ( $p= 0,175$ ).

**Conclusão:** Nosso trabalho mostrou uma expressão de GRPR em amostras de MM cutâneo na vasta maioria dos casos (82,4%). Em 30 amostras (58,3%), a expressão de GRPR foi considerada de forte intensidade. Não houve associação entre a intensidade de expressão de GRPR quando comparadas amostras de sítio primário versus metastático, níveis de Clark ou índices de Breslow. Este estudo é um dos primeiros na literatura a descrever uma expressão de GRPR elevada em amostras obtidas de pacientes portadores de MM cutâneo. Estudos subsequentes, preferencialmente com um maior número amostral, são necessários para confirmar estes achados e permitir melhor análise da expressão deste receptor em distintos subgrupos prognósticos. Se confirmados, os nossos dados podem justificar a realização de estudos que explorem novas estratégias terapêuticas utilizando agentes moduladores da expressão de GRPR em pacientes com MM refratário ao tratamento convencional.

**Palavras-chave:** peptídeo liberador de gastrina, melanoma, bombesina



## ABSTRACT

**Background:** The incidence of malignant melanoma (MM) is increasing worldwide and the management of patients with disseminated disease is a difficult problem. Chemotherapy was the treatment of choice in metastatic melanomas for many decades. However, this option produces disappointing results. Recently, the better understanding about molecular events related to the development of MM allowed the development of new drugs directed against specific molecular targets. The gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuroendocrine peptide shown to have growth-stimulatory effects on many types of murine and human cancers. Few data are available about GRP receptor (GRPR) expression in MM. The understanding about the molecular biology of MM may allow the identification of novel intracellular pathways of relevance in this disease, and potential GRPR modulators of therapeutic application in patients with refractory MM.

**Objectives:** The aim of this study was to determine the GRPR expression in biopsy samples of patients with cutaneous MM, as well as to correlate its expression with known prognostic factors of relevance in this disease.

**Methods:** Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy samples from 51 patients with cutaneous MM. A rabbit polyclonal anti-GRPR antibody (OPA1-15619, Affinity Bioreagents, USA) was used. Following the quantification of GRPR expression in the samples, the differences in GRPR expression among distinct prognostic MM subgroups were analyzed, using the Fisher's test.

**Results:** GRPR immunoexpression was demonstrated in cytoplasm of 42/51 (82.4%) cutaneous MM cases. It was strongly expressed in 30 (58.9%) of the samples. No

significant differences between GRPR expression neither in relation to the primary or metastatic site, nor among known prognostic subgroups Clark's level ( $p=0.35$ ) and Breslow index ( $p= 0.175$ ) was observed.

**Conclusion:** Our study has demonstrated the occurrence of a high GRPR expression in tumor specimens obtained from patients with cutaneous MM (82,4%). In 30 samples, a strong intensity of expression was documented (58.3%). No correlation was observed between the level of GRPR expression in primary or metastatic sites, nor for distinct Clark's levels or Breslow index. This is one of the first studies demonstrating a high GRPR expression in tumor samples from patients with MM. Further studies are warranted, preferably including a larger patient population, to allow a better analysis of the expression of these receptors in different prognostic subgroups. If these observations are confirmed, the therapeutic use of GRPR inhibitors should be considered in patients with advanced MM who failed conventional treatments.

**Keywords:** Gastrin-releasing peptide, malignant melanoma, bombesin

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão de GRP em tecidos neoplásicos humanos.....	24
Tabela 2. Índices de espessura de Breslow.....	29
Tabela 3. Níveis de invasão de Clark.....	30
Tabela 4. Sistema de Estadiamento TNM para melanoma maligno cutâneo - Estadiamento (AJCC 7ª edição).....	33
Tabela 5. Grupos de estadiamento TNM para melanoma maligno cutâneo - Agrupamento TNM (7ª edição).....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação espacial da taxa bruta de incidência de melanoma maligno da pele por 100 mil homens, estimada para o ano de 2012, no Rio Grande do Sul. .....	15
Figura 2. Representação espacial da taxa bruta de incidência de melanoma maligno da pele por 100 mil mulheres, estimada para o ano de 2012, no Rio Grande do Sul. .....	16
Figura 3. Sequências de aminoácidos contidos na Bombesina e no GRP.....	18
Figura 4. Vias de sinalização intracelulares moduladas por GRP.....	20
Figura 5. Característica dos melanomas malignos cutâneos.....	31
Figura 6. Coloração de imuno-histoquímica demonstrando expressão negativa para GRPR em nevo melanocítico – aumento de 400x .....	68
Figura 7. Coloração de imuno-histoquímica demonstrando expressão de GRPR positiva fraca no epitélio escamoso e negativa na derme de pele normal – aumento de 200x.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BB3R Receptor órfão da bombesina 3
- BB4R Receptor de bombesina de subtipo 4
- BLP Peptídeo semelhante a bombesina
- CTL-4 Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
- FDA Food and Drug Administration
- GRP Peptídeo Liberador de Gastrina
- GRPR Receptor preferencial do peptídeo liberador de gastrina
- VEGF Fator de crescimento vascular endotelial
- FGF Fator de crescimento fibroblástico
- IGF Fator de crescimento semelhante a insulina
- HDIL-2 Interleucina 2 em altas doses
- IHQ Imuno-histoquímica
- INCA Instituto Nacional do Câncer
- MM Melanoma maligno
- NMBR Receptor de neuromedina B
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- RNA Ácido ribonucléico
- RT-PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real
- TNM Tumor, linfonodos e metástases
- UV-A Ultravioleta tipo A
- UV-B Ultravioleta tipo B
- PD-1 Morte programada tipo 1
- PD-L1 Ligante de morte programada tipo 1

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Peptídeo Liberador de Gastrina – GRP .....	18
2.1.1 Definição e origem do GRP .....	18
2.1.2 Receptores de GRP .....	19
2.1.3 Funções fisiológicas do GRP .....	20
2.1.4 Relação de GRP com Câncer .....	21
2.1.5 Relação de GRP com Melanoma Maligno .....	27
2.2 Melanoma maligno (MM) .....	27
2.2.1 Epidemiologia .....	27
2.2.2 Fatores de risco .....	28
2.2.3 Aspectos patológicos .....	29
2.2.4 Estadiamento .....	31
2.2.5 Melanoma Ocular .....	35
2.2.6 Tratamento do Melanoma maligno – Aspectos de Terapia de alvo molecular .....	36
3 JUSTIFICATIVA .....	38
4 OBJETIVOS .....	39
4.1 Objetivo Geral .....	39
4.2 Objetivos Específicos .....	39
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO .....	40
6. ARTIGO SUBMETIDO PARA CLINICAL AND EXPERIMENTAL DERMATOLOGY .....	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64
8 ANEXOS .....	65
Anexo A. Técnica da Imuno-histoquímica .....	65
Anexo B. Quantificação dos resultados .....	66
Anexo C. Demais resultados não contidos no artigo .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

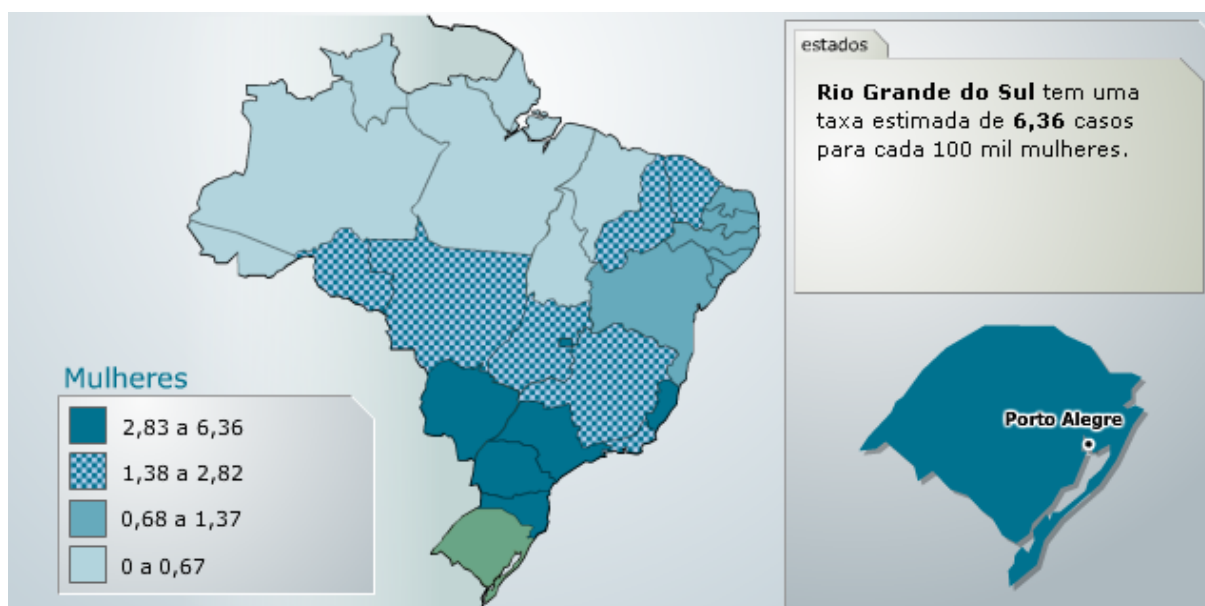
Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam cerca de 6230 novos casos de melanoma maligno (MM) no Brasil no ano de 2012. Dentre as regiões brasileiras, a Região Sul, que possui maior número de indivíduos de pele clara, é aquela em que se espera a maior incidência de MM. No Rio Grande do Sul a taxa estimada é de 6,71 novos casos para cada 100.000 homens (Figura 1) e 6,36 novos casos a cada 100.000 mulheres (Figura 2).<sup>1</sup>

Figura 1. Representação espacial da taxa bruta de incidência de melanoma maligno da pele por 100 mil homens, estimada para o ano de 2012, no Rio Grande do Sul.



(Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=10>)

Figura 2. Representação espacial da taxa bruta de incidência de melanoma maligno da pele por 100 mil mulheres, estimada para o ano de 2012, no Rio Grande do Sul.



(Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=10>)

A incidência de MM está aumentando em todo mundo e, embora nos últimos anos tenha aumentado o número de programas de rastreamento e detecção precoce, a mortalidade por essa doença não reduziu.<sup>2</sup>

Melanomas malignos são tumores agressivos, que apresentam chance elevada de tornarem-se metastáticos e disseminarem-se para múltiplos órgãos. A sobrevida estimada para pacientes com melanoma e metástases à distância é inferior a um ano.<sup>3</sup> O uso de quimioterapia com agentes citotóxicos, que por muitos anos foi a base do tratamento do melanoma metastático, apresenta resultados desanimadores. Mais recentemente, o conhecimento de alvos moleculares para atuação de novas terapias mostrou ser uma abordagem promissora, capaz de beneficiar pacientes com tumores que contenham determinadas características biológicas.<sup>4,5</sup>



O maior conhecimento sobre a biologia tumoral do MM poderá identificar vias de sinalização passíveis de serem inibidas por medicações dirigidas a alvos moleculares mais específicos nesta doença, aumentando potencialmente a sua eficácia e reduzindo os riscos de efeitos adversos comuns aos tratamentos menos seletivos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Peptídeo Liberador de Gastrina – GRP

#### 2.1.1 Definição e origem do GRP

A bombesina é uma proteína que foi isolada inicialmente a partir da pele de anfíbios *Bombina bombina*.<sup>6</sup> Posteriormente, foram identificados peptídeos semelhantes á bombesina (BLPs) em mamíferos.<sup>7</sup> O principal BLP foi denominado peptídeo liberador da gastrina, em virtude de sua ação em estimular a secreção de gastrina a partir das células G do antro gástrico.<sup>8</sup> O GRP compartilha com a bombesina uma sequência de sete aminoácidos em posição C-terminal, o que determina que a bombesina e o GRP apresentem efeitos fisiológicos similares.<sup>9</sup>

Figura 3. Sequências de aminoácidos contidos na Bombesina e no GRP.

<b>Bombesina</b> Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
<b>GRP</b> Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met- Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH <sub>2</sub>

(Fonte: Sunday, ME; Kaplan LM; Motoyama E; et al. Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. Lab. Invest., vol.59, p.5-24, 1988)

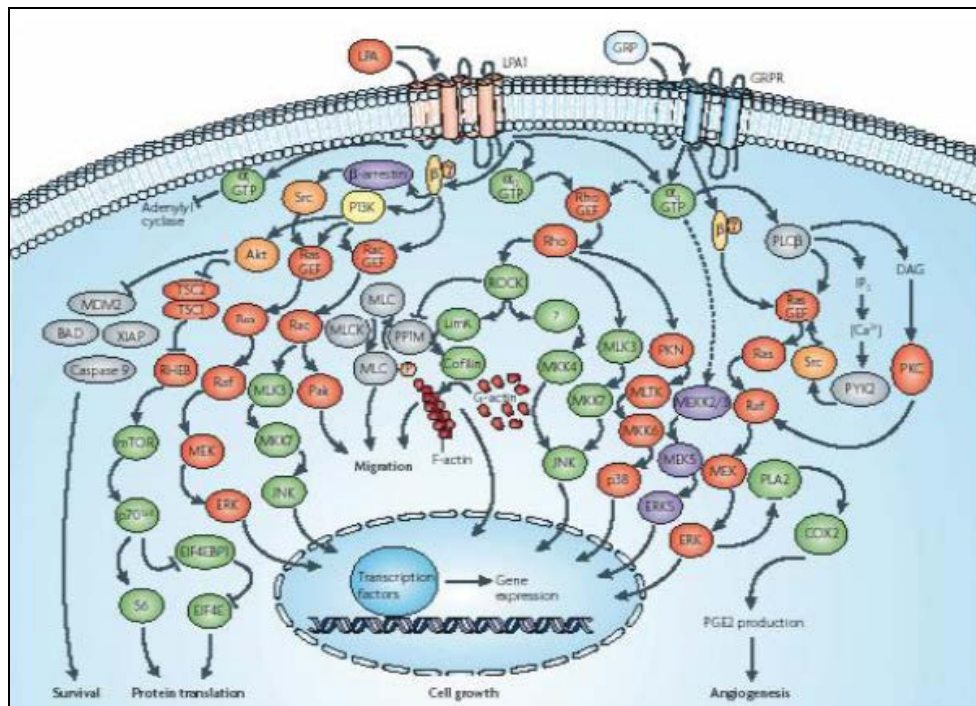
### 2.1.2 Receptores de GRP

Os receptores de GRP pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína G, que corresponde à maior família de moléculas de superfície celular envolvida na transmissão de sinais.<sup>10</sup> Essa sinalização é dependente da especificidade da ligação de cada receptor à proteína G.<sup>11</sup>

Identificaram-se quatro subtipos de receptores para a família dos BLPs: o receptor preferencial do GRP – GRPR, o receptor de neuromedina B – NMBR, o receptor órfão da bombesina 3- BB3R e o receptor de bombesina de subtipo 4 – BB4R. Esses receptores podem ser distinguidos por meio de sua afinidade pelos agonistas e antagonistas do GRP.<sup>12-15</sup>

O GRPR possui alta afinidade por bombesina e GRP.<sup>16</sup> A ligação de um agonista ao GRPR leva à ativação da fosfolipase C e aumento das concentrações de inositol trifosfato, diacilglicerol e cálcio.<sup>17</sup> Os GRPRs estão implicados na ativação de vias de sinalização celular que promovem crescimento e proliferação e interferem na migração celular e angiogênese.<sup>18-20</sup>

Figura 4. Vias de sinalização intracelulares moduladas por GRP



(Fonte: Giladi E, Nagalla SR, Spindel ER. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. J. Mol. Neurosci., v.4, p.41-54, 1993.)

### 2.1.3 Funções fisiológicas do GRP

O GRP está envolvido no estímulo a secreção ácida gástrica, liberação hormonal de gastrina, somatostatina e colecistocinina. Também estimula a secreção de enzimas pancreáticas e interfere na contração da musculatura lisa, além de desempenhar conhecido papel na neurotransmissão.<sup>21</sup>

Processos inflamatórios e imunológicos sofrem influência dos GRP,<sup>22,23</sup> sendo conhecido seu papel na modulação da função de linfócitos, fagócitos e mastócitos.<sup>24-</sup>

#### 2.1.4 Relação de GRP com Câncer

Nos últimos anos, várias linhas de pesquisa identificaram o peptídeo liberador de gastrina (GRP) e outros peptídeos análogos à bombesina como fatores de crescimento em alguns tipos de neoplasia. O mecanismo pelo qual o GRP exerce seu papel oncogênico não está completamente elucidado, reconhecendo-se que após a ligação ao seu receptor, múltiplas vias de sinalização celular são ativadas levando ao crescimento e proliferação celular, tais como proteína quinase C, fosforilação de tirosina quinase de adesão focal e mobilização de cálcio.<sup>27-29</sup>

O reconhecimento do GRP como um fator de crescimento autócrino iniciou a partir da detecção do GRP e seu receptor, e do reconhecimento de ação antiproliferativa de anticorpos dirigidos ao receptor do GRP em carcinoma de pequenas células de pulmão.<sup>18</sup> Dados mais recentes mostram que o GRP não apresenta apenas ação mitogênica autócrina, mas também efeito parácrino e endócrino, além de funcionar como agente morfogênico e proangiogênico.<sup>27</sup>

A expressão de GRPR foi determinada em vários tipos de neoplasias humanas. Foram encontrados índices de expressão variáveis de GRPR no RNA mensageiro em amostras de tecido de câncer de próstata e de hipertrofia prostática benigna, através da técnica de PCR. A concentração do RNAm no tecido neoplásico variou de muito alta a indetectável (30% dos casos) enquanto o tecido não tumoral apresentava consistentemente índices baixos.<sup>30</sup> Em outro estudo, GRPR foi detectado em 100% das amostras de carcinoma prostático invasivo (30/30) e neoplasia prostática intraepitelial (26/26), ao passo que no tecido glandular não neoplásico, a expressão foi muito discreta.<sup>31</sup> Quando avaliado por meio da técnica de ligação ao receptor, verificou-se 68% de alta afinidade para GRPR em 80 amostras

de neoplasia prostática, ao passo que a mesma amostra submetida à técnica de PCR mostrou 91% de expressão para RNAm de GRPR.<sup>32</sup>

Com relação à expressão de GRPR em neoplasia de mama, Halmos e colaboradores reportaram 33% (33/100) de amostras positivas.<sup>33</sup> Outro estudo avaliou a expressão do receptor em tecido mamário sadio e neoplásico, encontrando distribuição elevada, porém heterogênea em 63% de células epiteliais do tecido mamário neoplásico (29/46) e em 65% (11/17) dos carcinomas ductais *in situ*.<sup>34</sup>

Foi identificado RNAm do GRPR em apenas 8% (2/26)<sup>35</sup> e 17% (2/12)<sup>36</sup> de amostras de adenocarcinoma de pâncreas. Com esses resultados os autores inferiram que o conhecido efeito *in vivo* que o GRP determina no tecido pancreático deva ser secundário a efeitos indiretos resultantes do estímulo a liberação de outros hormônios com ação direta no pâncreas.

A avaliação de amostras de câncer colorretal e mucosa normal adjacente por diferentes métodos demonstrou expressão mais intensa de GRPR no tecido neoplásico.<sup>37,38</sup> Ademais, quando a expressão foi correlacionada com características e fatores prognósticos, verificaram-se taxas de expressão significativamente maiores em tumores indiferenciados e naqueles com invasão angiolímfática.<sup>39</sup>

Foi verificada expressão de GRPR em carcinomas de células renais humanas, mas não em tecido renal normal.<sup>40</sup> Também foi determinada a expressão em linhagens celulares de câncer renal, o que permitiu o estudo *in vitro* de agonistas e antagonistas do GRPR. Foi verificado que a bombesina estimulou o crescimento celular e que seu antagonista reverteu esse efeito. Dessa forma, os autores inferiram que a transformação maligna do tecido renal em carcinoma de células renais é acompanhado pela expressão de receptores de GRPR.<sup>40</sup> Outros autores avaliaram

o efeito do bloqueio do GRPR na angiogênese em carcinoma de células renais. Para tanto foi monitorada a angiogênese em amostras de linhagem celular tipo A498 implantadas em ratos submetidos ao bloqueio de receptor de GRPR pelo antagonista RC-3095. Verificou-se que a neoangiogênese tumoral foi inibida pelo antagonista do GRPR, levando a conclusão de que a angiogênese do carcinoma renal é sensível ao bloqueio do GRPR e que esse além de estimular a proliferação celular, apresenta efeito na microcirculação tumoral.<sup>41</sup>

Também se verificou expressão de GRPR significativamente elevada em amostras de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço quando comparado a tecido sadio. Foi correlacionada a expressão no tumor e tecido epitelial adjacente, levando a conclusão de que a expressão de GRPR é um evento precoce na formação do carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, parecendo pertencer a uma via regulação autócrina.<sup>42</sup>

Foi observada também expressão de GRPR em 83% das amostras e nas quatro linhagens celulares testadas de carcinoma escamoso de esôfago<sup>43</sup>. O mesmo estudo encontrou índices de expressão mais elevada em células tumorais do que nas de hiperplasia de células basais, sugerindo que a expressão de GRPR tenha papel no desenvolvimento e crescimento dessa neoplasia. A avaliação em tumores carcinoides do trato gastrointestinal mostrou expressão de 84% para GRPR.<sup>44</sup>

Tabela 1. Expressão de GRP em tecidos neoplásicos humanos.<sup>32</sup>

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

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



A observação de que GRP desempenha função na proliferação celular e na angiogênese tumoral, aliado ao fato de seu receptor estar expresso em muitos tipos de neoplasia levou ao desenvolvimento de antagonistas do GRP, como potenciais agentes com ação antitumoral. Esses análogos podem ocupar receptores específicos, mas são incapazes de ativar as vias de sinalização celular.<sup>27</sup>

O mecanismo de inibição tumoral de antagonistas de GRP não está completamente elucidado e parece ser mais complexo que a simples competição ativa pelo receptor. Um dos mecanismos de ação principais parece envolver a redução dos níveis de receptores da família Her, incluindo EGF-R, Her-2 e Her-3,<sup>33,45</sup> atenuação da expressão de oncogenes incluindo c-fos, c-jun<sup>46</sup>, KRAS, COX-2 e proteínas quinases incluindo MAPK.<sup>47</sup> Ocorre também inibição da neovascularização pela interferência com fatores de crescimento importantes para a neoangiogênese, como VEGF, bFGF e receptores correspondentes.<sup>48</sup>

RC-3095 e RC-3940-II são exemplos de antagonistas do GRP testados em numerosos estudos. Com o emprego desses agentes, verificou-se que antagonistas de GRP foram capazes de inibir o crescimento de linhagens celulares de câncer de próstata hormônio-independente PC-3 *in vivo*, possivelmente por exercer efeito inibitório direto no crescimento tumoral por meio do *down-regulation* de receptores de EGF,<sup>49</sup> além de demonstrar eficácia no tratamento de câncer prostático avançado em modelos animais pré-clínicos.<sup>50</sup>

O emprego de RC-3940-II e RC-3095 em linhagens celulares de câncer de mama estrogênio-independente MDA-MB-231 implantadas em camundongos mostrou redução de volume tumoral final de 72,4% e 57,7% respectivamente. Houve diminuição significativa no número de sítios de ligação para EGF e bombesina após exposição crônica aos antagonistas.<sup>51</sup> Os mesmos antagonistas também inibiram o

crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-468 e MDA-MB-435 implantadas em camundongos, observando-se nítida redução da expressão de RNAm e de níveis proteicos da família de receptores ErbB/HER e diminuição da expressão de oncogenes c-fos e c-jun.<sup>52</sup> Por meio de da implantação de tumores de mama em camundongos foi possível observar que esses animais quando submetidos a RC-3095 e RC 3940-II apresentaram redução significativa da densidade de vasos tumorais e da atividade da matriz metaloproteinase. A inibição do crescimento tumoral ocorreu em associação a redução significativa da expressão de RNAm e níveis proteicos de fatores de crescimento fibroblástico, IGF-II e VEGF-A tumoral.<sup>53</sup>

O crescimento da linhagem celular U-87MG de glioblastoma maligno implantada em camundongos foi inibida com emprego de RC3095 e RC-3940-II por mecanismos relacionados a *down-regulation* do oncogene c-fos.<sup>54</sup> Os mesmos antagonistas quando testados em linhagem celular de câncer de ovário OV-1063 foram capazes de inibir o crescimento tumoral, associado à redução dos níveis de oncogenes c-fos e c-jun.<sup>46</sup>

Foi conduzido em nossa instituição um estudo de fase I com RC-3095 em pacientes com vários tipos de neoplasias sólidas avançadas e refratárias. O antagonista mostrou ter perfil de toxicidade favorável. Não foi verificada resposta tumoral, entretanto a dose máxima não foi atingida.<sup>55</sup>

### **2.1.5 Relação de GRP com Melanoma Maligno**

A avaliação da expressão de GRPR em tecido cutâneo sadio demonstrou, por meio dos métodos de imuno-histoquímica, citometria de fluxo e microscopia eletrônica, ocorrer na derme e epiderme de tecidos cutâneos sadios. Na derme verificou-se expressão de GRPR em nervos e vasos, além de glândulas sebáceas e músculo eretor do pêlo. Na epiderme ocorre em toda sua espessura.<sup>56,57</sup>

Quanto á expressão de GRPR em melanoma, os poucos dados são disponíveis. Utilizando-se o método de PCR, foi encontrado RNA mensageiro de GRPR em culturas de células de melanoma humano.<sup>58</sup> A avaliação por meio de imuno-histoquímica em tecido de melanoma cutâneo demonstrou expressão de GRPR em aproximadamente 43% dos casos analisados, ocorrendo principalmente no tipo histológico nodular e em todos os níveis de Clark.<sup>57</sup> Esses dados provêm de um único estudo, não havendo confirmação por outros autores ou avaliação conforme outras variáveis do melanoma. Não existem dados conhecidos quanto à expressão de GRPR em melanoma ocular.

## **2.2 Melanoma maligno (MM)**

### **2.2.1 Epidemiologia**

A incidência de MM está aumentando em todo o mundo e em todos os níveis socioeconômicos. Os indivíduos de poder aquisitivo mais baixo foram os que demonstraram maior aumento da taxa de incidência da doença, o que sugere que exista um aumento real no número de casos e não somente maior taxa de

diagnóstico por rastreamento.<sup>59</sup> No Brasil verificou-se, além do aumento da incidência, aumento da mortalidade nas últimas décadas. No Rio Grande do Sul, a incidência de MM nas mulheres mais que triplicou e quase dobrou nos homens, nas últimas duas décadas.<sup>60</sup>

### **2.2.2 Fatores de risco**

Os fatores de risco para o desenvolvimento de MM podem ser genéticos ou ambientais, sendo que a interação desses fatores contribui para a variação na incidência entre grupos étnicos e entre regiões geográficas.<sup>61</sup>

Evidências clínicas e epidemiológicas demonstram que a exposição solar é o principal fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. Neste sentido, a exposição de tipo intermitente e intensa parece associada a um maior risco.<sup>62</sup> Além disso, a maioria das lesões primárias ocorre em áreas expostas ao sol. A radiação ultravioleta de tipo B (UV-B) parece estar mais associada ao desenvolvimento de MM do que a de tipo UV-A.<sup>63</sup>

Fatores específicos do paciente também influenciam o risco de desenvolvimento de MM, tais como elevado número de nevos típicos, presença de nevo atípico, história pessoal dessa neoplasia e predisposição genética.<sup>64-70</sup> Pacientes com a síndrome de múltiplos nevos atípicos e melanoma familiar apresentam um risco muito acima da população geral para desenvolvimento dessa neoplasia.<sup>71,72</sup> Melanomas malignos também incidem mais em pacientes imunossuprimidos, como os transplantados. Nessa população, a chance de recidiva de um MM tratado antes do transplante também é elevada, principalmente nos primeiros anos pós-transplante.<sup>73,74</sup>

### 2.2.3 Aspectos patológicos

Melanomas malignos apresentam dois tipos distintos de crescimento; a fase radial e a vertical. Na fase de crescimento radial a proliferação dos melanócitos malignos é restrita a epiderme e porção superior da derme, ao passo que na fase de crescimento vertical existe invasão dérmica, podendo haver formação de nódulos na derme.<sup>75</sup> O MM *in situ* é uma forma de crescimento radial do melanoma, com proliferação de melanócitos malignos confinada à epiderme.<sup>76</sup> Biologicamente, melanomas com fase de crescimento vertical apresentam diferentes expressões de antígenos de superfície, perfil citogenético e características de crescimento que influenciam seu potencial de metastatização.<sup>77,78</sup>

A espessura do tumor mostrou ser fator prognóstico importante no MM localizado.<sup>79</sup> Para categorizar esse fator são utilizadas as classificações de Breslow e Clark, que baseiam-se na espessura do tumor e no nível de invasão da pele, respectivamente.<sup>80</sup>

Tabela 2. Índices de espessura de Breslow

Índices de espessura de Breslow	
I	espessura menor que 0,75mm
II	espessura de 0,75 a 1,5 mm
III	espessura de 1,6 a 3,0 mm
IV	espessura de 3,1 a 4 mm
V	espessura maior que 4 mm

(Adaptado de: Breslow, Alexander (1970). Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery* 172 (5): 902-8)

Tabela 3. Níveis de invasão de Clark

Níveis de invasão de Clark	
I	células melanocíticas malignas <i>in situ</i>
II	invasão além da membrana basal restrita a derme papilar
III	invasão tumoral atingindo parte da derme reticular
IV	invasão tumoral de toda a derme reticular
V	invasão do tecido celular subcutâneo

(Adaptado de: Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29:705)

Melanomas malignos apresentam significativa diversidade morfológica entre os quatro grupos histológicos distintos. Embora esses grupos não se correlacionem diretamente com comportamento clínico tumoral, a subclassificação é útil para diagnóstico e reconhecimento histopatológico.<sup>82</sup>

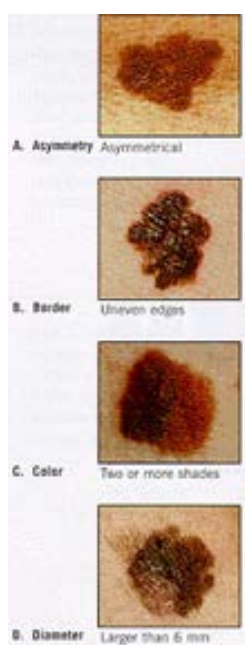
O subtipo mais prevalente é o melanoma de espalhamento superficial, que corresponde a aproximadamente 75% dos casos. A origem do nome desse subgrupo deve-se a evidência histológica de que ocorre um período de crescimento lateral, radial, antes de haver crescimento vertical, invasivo.<sup>75</sup>

O subtipo lentigo maligno melanoma ocorre principalmente em áreas de exposição solar em idosos. Comumente iniciam como uma mácula que progressivamente torna-se espessa e mais enegrecida. O processo de progressão para um tumor de crescimento vertical é lento, podendo levar vários anos até tornar-se aparente.<sup>83</sup>

O subtipo melanoma lentiginoso acral origina-se de superfícies de mucosa, regiões palmo-plantares ou subungueais. Correspondem a uma variante de crescimento radial infrequente.<sup>84</sup>

No subtipo melanoma nodular há melanoma em fase de crescimento vertical. Apresentam-se como nódulos pigmentados, podendo ser ulcerados. Histologicamente encontra-se um nódulo de células neoplásicas na derme, não se verificando fase de crescimento radial adjacente.<sup>85</sup>

Figura 5. Característica dos melanomas malignos cutâneos. (A) Assimetria, (B) Margens assimétricas, (C) Mais de uma tonalidade, (D) Diâmetro maior de 6 mm.



(Fonte: BARNHILL, R. L. Malignant melanoma, dysplastic nevi, and Spitz tumors. Histological classification and characteristics. *Clin Plast Surg*, v. 27, n. 3, p. 31-60, 2000)

#### 2.2.4 Estadiamento

O sistema de estadiamento utilizado para melanoma mais comumente utilizado foi desenvolvido pelo American Joint Committee on Câncer (AJCC) e posteriormente adotado pela International Union for Cancer Control (UICC). Esse sistema avalia o tumor primário (T), envolvimento linfonodal (N) e presença de

metástases (M), sendo denominado sistema TNM, atualmente em sua sétima edição.<sup>86,87</sup>



Tabela 4. Sistema de Estadiamento TNM para melanoma maligno cutâneo -  
Estadiamento (AJCC 7ª edição)

Tumor primário (T)	
TX	Tumor primário não pode ser determinado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Melanoma <i>in situ</i>
T1	<ou 1mm a: sem ulceração e mitoses <1/mm <sup>2</sup> b: com ulceração ou mitose >ou 1mm <sup>2</sup>
T2	1,01 a 2mm a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 a 4 mm a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4mm a: sem ulceração b: com ulceração
Linfonodos Regionais (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser determinados
N0	Sem evidência de metastase regional
N1	1 linfonodo acometido a: micrometástase b: macrometástase
N2	2 ou 3 linfonodos a: micrometástase b: macrometástase c: metástases em transito sem linfonodos metastáticos
N3	4 ou mais linfonodos metastáticos ou linfonodos fusionados, ou metástases em trânsito com linfonodos metastáticos
Metástases á distância (M)	
M0	sem evidência de metástases á distância
M1a	Metástases para pele, subcutâneo ou linfonodo á distância, LDH sérico normal
M1b	Metástase para pulmão, LDH sérico normal
M1c	Metástase para outras vísceras ou qualquer metástase com LDH sérico elevado

(Adaptado de: Melanoma of the skin. In: American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup>,

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p.325)

Tabela 5. Grupos de estadiamento TNM para melanoma maligno cutâneo -  
Agrupamento TNM (7ª edição)

EstadiamentoTNM			
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio Ia	T1a	N0	M0
Estágio Ib	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
Estágio IIa	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
Estágio IIb	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Estágio IIc	T4b	N0	M0
Estágio III	qualquer T	N1,N2 ou N3	M0
Estágio IV	qualquer T	qualquer N	M1
Estadiamento patológico			
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio Ia	T1a	N0	M0
Estágio Ib	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
Estágio IIa	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
Estágio IIb	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Estágio IIc	T4b	N0	M0
Estágio IIIa	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
Estágio IIIb	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a	N2c	M0
Estágio IIIc	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	T1-4b	N2c	M0
Estágio IV	qualquer T	N3	M0
Estágio IV	qualquer T	qualquer N	M1

(Adaptado de: Melanoma of the skin. In: American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup>,

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p.325.)

### 2.2.5 Melanoma Ocular

Os melanomas uveais correspondem a 95 % dos melanomas oculares. Eles podem se originar da íris, corpo ciliar e coróide. Apresentam diferenças importantes de comportamento, agressividade e resposta ao tratamento em relação aos MM cutâneos.<sup>88</sup> O risco de transformação maligna de um nevo pigmentado é cerca de 7%, com risco mais elevado em nevos com espessura maior que 2 milímetros, acúmulo de fluido subretiniano , com sintomas visuais ou presença de pigmento laranja.<sup>89</sup> O tratamento local pode ser realizado de forma cirúrgica com enucleação ou radioterápica.

Apesar da eficácia do tratamento primário, morte por metástases ocorre em aproximadamente 23% dos casos tratados.<sup>90</sup> Os fatores mais associados com pior prognóstico são tamanho do tumor, envolvimento do corpo ciliar, idade avançada e extensão extra-escleral.<sup>91,92</sup>

Os melanomas de conjuntiva correspondem a 5 % dos casos.<sup>93</sup> Esses tumores têm maior propensão para recorrência local do que metastatização.<sup>94</sup>

Não existe tratamento eficaz para a maioria dos melanomas oculares metastáticos. Dados do uso de quimioterapia sistêmica são desanimadores, e a pouca compreensão da fisiopatogenia molecular desse tumor limita o uso de terapias-alvo.<sup>95</sup> A sobrevida mediana estimada para pacientes com melanoma ocular metastático é inferior a um ano.<sup>96,97</sup>

## 2.2.6 Tratamento do Melanoma maligno – Aspectos de Terapia de alvo molecular

A ressecção cirúrgica é a base do tratamento dos MM em estágios iniciais, sendo recomendada, em geral, margens cirúrgicas de até 2 centímetros.<sup>98</sup> A biópsia de linfonodo sentinela é importante para o estadiamento e como fator prognóstico.<sup>99</sup> Geralmente é indicada em MM com espessura superior a 1 milímetro.<sup>83</sup> Quanto ao benefício em sobrevida com a linfadenectomia regional após biópsia positiva, os resultados são conflitantes.<sup>101</sup>

A terapia adjuvante para MM ressecado apresenta resultados limitados. O interferon alfa é a única medicação aprovada para essa finalidade pelo US Food and Drug Administration (FDA).<sup>102</sup> O emprego dessa terapia mostrou aumentar discretamente a sobrevida global nos pacientes tratados.<sup>103</sup>

Para a doença metastática, até 2011 somente duas terapias estavam aprovadas pelo FDA: dacarbazina e altas doses de interleucina 2 (HDIL-2), ambas sem aumento de sobrevida global.<sup>104-106</sup> Dacarbazina apresenta taxa de resposta de 10 a 15% e sobrevida global de oito meses.<sup>104</sup> HDIL-2 apresenta toxicidade grave ao tratamento, com a minoria dos pacientes obtendo benefício em longo prazo.<sup>105-106</sup>

O reconhecimento recente de mutações com alvos moleculares envolvidos na oncogênese e avanços na compreensão da imunologia tumoral possibilitaram o surgimento de novas drogas capazes de produzir respostas encorajadoras com perfil de toxicidade mais favorável.<sup>107</sup>

O Ipilimumab é um anticorpo monoclonal totalmente humanizado contra CTL-4 (antígeno 4 de linfócito T citotóxico), aumentando a atividade de células T e com isso promovendo atividade antitumoral.<sup>108</sup> Dois estudos clínicos randomizados de

fase 3 avaliaram o papel do Ipilimumab em melanoma metastático.<sup>109,109</sup> Quando avaliado em pacientes previamente tratados com estágio III irresssecáveis e IV, o Ipilimumab demonstrou aumentar significativamente a sobrevida global em relação ao uso de vacina de peptídeo de glicoproteína 100 (10,1 versus 6,4 meses).<sup>109</sup> Quando avaliado como tratamento inicial, o Ipilimumab associado à Dacarbazina mostrou aumento de sobrevida global quando comparado com Dacarbazina isoladamente (11,2 versus 9,2 meses).<sup>108</sup>

Mutações ativadoras no gene BRAF estão presentes em 40 a 60% dos MM avançados.<sup>110,111</sup> Vemurafenib é um inibidor específico do BRAF ativado que demonstrou atividade em pacientes com tumores que contém mutação V600 no gene BRAF. Quando o uso dessa medicação foi comparado a dacarbazina em pacientes sem tratamento prévio com melanoma estágio III irresssecável ou IV, o uso de Vemurafenib associou-se a um ganho significativo de sobrevida global (84% versus 64% em seis meses) e sobrevida livre de progressão (5,3 versus 1,6 meses).<sup>112</sup>

Recentemente foi reconhecido que o bloqueio do receptor inibitório expressado por células T, morte programada tipo 1 (PD-1) pode melhorar a resistência imune, o que motivou um estudo de atividade e segurança de um agente que bloqueia PD-1 em pacientes com tumores avançados, incluindo MM. Verificou-se resposta objetiva em aproximadamente um quarto dos pacientes com MM tratados com anticorpo anti-PD-1, sendo maior a resposta naqueles que apresentavam expressão tumoral do ligante do PD-1 (PD-L1).<sup>113</sup>

### 3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, os avanços no conhecimento da biologia molecular e imunogenética possibilitaram o surgimento de novas opções terapêuticas para pacientes portadores de MM avançado. Estes novos medicamentos, dirigidos a alvos moleculares específicos, apresentam resultados promissores e um perfil de toxicidade mais favorável do que os tratamentos convencionais. A expressão de GRPR já foi demonstrada em alguns tipos de tumores malignos e poucos dados são conhecidos sobre sua expressão em MM.

O RC-3095 é um antagonista seletivo do GRPR em estudos clínicos iniciais em nossa instituição. Uma vez que este agente não demonstrou efeitos tóxicos limitantes em ensaio de fase I em pacientes portadores de neoplasias malignas avançadas refratárias ao tratamento, torna-se fundamental a identificação dos tipos de câncer a serem priorizados em futuros ensaios de fase II. Neste sentido, a avaliação dos níveis de expressão de GRPR em MM é etapa essencial neste processo, já que é condição fundamental para a sua inclusão em ensaios clínicos de fase II com o RC-3095.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Determinar a prevalência da expressão de GRPR em material de biópsia de pacientes portadores de MM.

### **4.2 Objetivos Específicos**

a) Determinar a expressão de GRPR em biópsias de MM oriundas de sítio primário ou metastático da lesão.

b) Relacionar a expressão de GRPR em biópsias de MM com distintos níveis de espessura de Breslow e de invasão de Clark.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativas da incidência de câncer no Brasil em 2012. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=10>
2. Geller AC , Muler DR, Annas GD, et al. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. JAMA 2002; 288:1719.
3. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. N Engl J Med 2004;351:998-1012[Erratum, N Engl J Med 2004;351:2461.]
4. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med 2010; 36:809
5. Hodi FS, O'Day SJ, Mc Dermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. N Engl J Med 2010; 363:711-23.
6. 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.
7. Johnson, D.E, Lock, J.E, Elde RP et al. Pulmonary neuroendocrine cells in hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. Pediatr. Res.v.16, p. 446-454, 1982.
8. McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. Biochem Biophys Res Comm 1979;90:277-82
9. Sunday, ME; Kaplan LM; Motoyama E; et al. Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. Lab. Invest., vol.59, p.5-24, 1988.
10. Dorsam, RT; Gutkind, JS. G-protein-coupled receptors and cancer. Nature Rev. Cancer, v.7, p. 79-94, 2007.
11. Benya RV. Glycosilation of the gastrin-releasing peptide receptor and its effect on expression, G protein coupling, and receptor modulatory process. Mol Pharmacol. 2000 Dec; 58(6): 1490-501.
12. Spindel ER, 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. 1956-63, 1990.
13. 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. 421-30, 1991.



14. Fathi Z, Corjay MH, 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.5979-84, 1993.
15. Nagalla SR, Barry KC, 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.6205-09, 1995.
16. Giladi E, Nagalla SR, Spindel ER. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. *J. Mol. Neurosci.*, v.4, p.41-54, 1993.
17. Hellmich MR. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor- regulated secretion. *J. Biol. Chem.* 1999, Aug 20; 274(34):23901-9.
18. Aprikian AG. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells throught tirosina kinase and of integrin associated proteins. *Int. J. Cancer.* 1997 Jul 29; 72(3):498-504.
19. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.*, v.22, p. 368-76, 2001.
20. Rozengurt E, Guha S, Smith J. Gastrointestinal peptide signaling in health and disease. *Eur. J. Surg.* V.587, p. 23-38, 2002.
21. Bunnet N. Gastrin releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ (editors): *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. New York, Raven Press, p. 423-445, 1994.
22. Pereira DV. Effects of an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor in an animal model of uveitis. *Invest Ophtalmol Vis Sci.* 2009; Nov 50(11):5300-03
23. Petronilho F. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor agonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides* 2009 Aug; 30(8):1460-5.
24. Medina S, Del Rio M, de la Cuadra B, ET al. Age-related changes in the modulatory action of the gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides*, v. 33, p. 173-9, 1999.
25. De la Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD ET al. Modulation of phagocitic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology*, v. 73(2), p. 205-11, 1991.

26. Subramanian M, Sugiyama K, Coi DH, et al. Bombesin-like peptides and mast cells responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 8, p. 601-11, 2003.
27. Patel, O., A. Shulkes, and G. S. Baldwin. 2006. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1766:23–41
28. Xiao, D., X. Qu, and H. C. Weber. 2002. GRP receptor-mediated immediate early gene expression and transcription factor Elk-1 activation in prostate cancer cells. *Regul. Pept.* 109:141–148.
29. Aprikian, A. G., L. Tremblay, K. Han, and S. Chevalier. 1997. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int. J. Cancer* 72:498–504.
30. Bartholdi MF, Wu JM, Pu H ET al. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 79(1), p. 82-90, 1998 Bartholdi MF, Wu JM, Pu H ET al. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 79(1), p. 82-90, 1998
31. Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptor in the human prostate: relation to the neoplastic transformation. *Cancer Res.*, v. 59, p. 1152-59, 1999.
32. Sun B, Halmos G, Schally AV, et al. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancer. *Prostate*, v.42(4), p.295-303, 2000.
33. Halmos G, Wittliff JL, Schally AV. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Res* 1995; 55(2): 280-87.
34. Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 1999; 155(6): 2067-2076
35. Ehlers RA, Kim S, Zhang Y et al. Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers. *Ann Surg* 2000; 231(6):838-848.
36. Tang C, Biemond I, Offerhaus GJ et al. Expression of receptors for gut peptides in human pancreatic adenocarcinoma and tumor-free cancer. *Br J Cancer* 1997; 75 (10):1467-1473.
37. Chave HS, Gouch AC, 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

38. Carrol RE, Matkowskyj KA, Chakrabarti S et al. Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated colon cancers in humans. *Am J Physiol* 1999, 276(3pt 1):G655-G665.
39. Saurin JC, Roualt JP, Abello J et al. High gastrin-releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35(1): 125-132.
40. Pansky A, de Weerth A, Fasler-Kan et al. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *J Am. Soc. Nephrol*,v.11(8),p.1409-18, 2000
41. Heuser M, Schlott T, Schally AV, et al. Expression of gastrin-releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. 2005, *J. Urol*.173:2154-2159.
42. Lango MN, Dyer KF, Lui VW. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nat Cancer Inst* 2002 ; 94(5):375-383.
43. Fang MZ, Liu C, Song Y et al. Over-expression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2004; 25(6):865-871.
44. Scott N, Millward E, Cartwright EJ et al. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. *J Clin Pathol* 2004; 57(2):189-192.
45. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, et al. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10913-10918
46. Chatzistamou I, Schally AV, Sun B et al. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer* 2000;83:906-13
47. Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, et al. Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of k-ras, cox-2 and pAkt. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1871-6
48. Hohla F, Schally AV. Targeting gastrin releasing peptide receptor. *Cell Cycle* 2010;9:1738-41
49. Jungwirth A, Galvan G, Pinski J et al. Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3 prostate cancer in nude mice. *Prostate* 1997; 32 (3): 164-172.

50. Stangelberger A, Schally AV, Letsh M et al. Target chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 inhibits growth of experimental human prostate cancers. *Int J Cancer* 2006; 118 (1):222-229.
51. Miyazaki M, Lamharzi N Schally AV et al. Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC 3095. *Eur J Cancer* 1998;34 (5):710-717.
52. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007; 18: 1457–1466.
53. Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 2004;90(1):245-252
54. Kiaris H, Schally AV, Sun B et al. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene* 1999; 18(50):7168-7173.
55. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006;24(5):403-412
56. Staniek V. Expression of gastrin-releasing peptide receptor in human skin. *Acta Derm Venereol* 1996; 76(4):282-286.
57. Charitopoulos K, Lazaris A, Aroni K. Immunodetection of gastrin-releasing peptide in malignant melanoma cells. *Melanoma Research* 2000, 10: 395-400.
58. Pansky A, Peng F, Eberhard M ET AL. Identification of functional GRP- preferring bombesin receptors on human melanoma cells. *European Journal of Clinical Investigation* 1997; 27:69-76.
59. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, et al. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol* 2009; 129:166.
60. Bakos L. Melanoma cutaneo: estudos de base populacional no Brasil. *An Bras Dermatol.* 2006;81(5):402.
61. Tsao HK, Pehamberger H, Sober AJ. Precursors lesions and markers for increased risk of melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, *Cutaneous Melanoma* (Ed), Quality Medical Publishing Inc, St. Louis 1998, p.65
62. Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 1340-1341.
63. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997; 73:198.

64. Caini S, Gandini S, Sera F, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer* 2009; 45:3054.
65. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rates of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol* 2003; 139:282.
66. Bradford PT, Freedman DM, Goldstein AM, Tucker MA. Increased risk of second primary cancers after a diagnosis of melanoma. *Arch Dermatol* 2010; 146:265.
67. Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, et al. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA* 2005; 294:1647.
68. Spanogle JP, Clarke CA, Aroner S, et al. Risk of a second primary malignancies following cutaneous melanoma diagnosis: a population-based study. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62:757.
69. Goldstein AM, Dracopoli NC, Engelstein M, et al. Linkage of cutaneous malignant melanoma/ dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1994; 54:489.
70. Carey WP, Thompson CJ, Synnestvedt M, et al. Dysplastic nevi as a melanoma risk factor in patients with familial melanoma. *Cancer* 1994; 74:3118.
71. Lynch HT, Frichot BC, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15:352.
72. Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, et al. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. The B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978; 114:732.
73. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 1996; 61:274.
74. Penn I. The effect of immunosuppression on pre-existing cancers. *Transplantation* 1993; 55:742.
75. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29:705.
76. Tannous ZS, Lerner LH, Duncan LM, et al. Progression to invasive melanoma from malignant melanoma in situ, lentigo maligna type. *Hum Pathol* 2000, 31:705.
77. Satyamoorthy K, De Jesus E, Linnenbach AJ, et al. Melanoma cell lines from different stages of progression and their biological and molecular analysis. *Melanoma Res* 1997; 7 Suppl2:S35.

78. Bouckerche H, Baril P, Tabone E, et al. A new Mr 55,00 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype. *Cancer Res* 2000; 60:5848.
79. Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer*. 1996;78(3):427-32.
80. Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. *Cancer*. 2000;88(3):589-95. Comment in: *Cancer*. 2000 Feb1;88(3):491-6.
81. Breslow, Alexander (1970). "Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma". *Annals of Surgery* 172 (5): 902–8
82. Mc Govern VJ, Mihm MC Jr, Bailly C, et al. The classification of malignant melanoma and its histopatologic reporting. *Cancer* 1973; 32:1446.
83. Clark WH Jr, Mihm MC Jr. Lentigo maligna and lentigo maligna-melanoma. *AM J Pathol* 1969; 55:39.
84. Coleman WP, Loria PR, Reed RJ, ET AL. Acral lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 1980; 116:773.
85. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* 1986; 17:443.
86. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27:6199.
87. Melanoma of the skin. In: American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup>, Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p.325.
88. Albert DM, Ryan LM, Borden EC. Metastatic ocular and cutaneous melanoma: a comparison of patient characteristics and prognosis. *Arch Pphthalmol* 1996; 114:107.
89. Shields CL, Furuta M, Berman EL, et al. Choroidal nevus transformation into melanoma: analyses of 2514 consecutive cases. *Arch Ophthalmol* 2009; 127:981.
90. Char DH, Kroll SM, Castro J. Ten-year follow up of helium ion therapy for uveal melanoma. *Am J Ophtalmol* 1998; 125:81.

91. Schmittel A, Bechraikis NE, Martus P, et al. Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma. *Eur J Cancer* 2004; 40:2389.
92. Kleinedam M, Guthoff R, Bentzen, et al. Rates of local control, metastasis, and overall survival in patients with posterior uveal melanomas treated with ruthenium-106 plaques. *Radiother Oncol* 1993; 28:148.
93. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* 1998; 83:1664.
94. Shields CL. Conjunctival melanoma: risk factors for recurrence, exenteration, metastasis, and death in 150 consecutive patients. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000; 98: 471.
95. Flaherty LE, Unger JM, Liu PY, et al. Metastatic melanoma from intraocular primary tumors: the Southwest Oncology Group experience in phase II advanced melanoma clinical trials. *Am J Clin Oncol* 1998; 21:568.
96. Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, et al. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:8076.
97. Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2009; 148:119.
98. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, et al. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 4:CD004835.
99. Thirlwell C, Nathan P. Melanoma—part 2: management. *BMJ* 2008;337:a2488.
100. Cook J. Surgical margins for resection of primary cutaneous melanoma. *Clin Dermatol* 2004;22(3):228–33.
101. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(13):1307–17.
102. Wheatley K, Ives N, Hancock B, et al. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev* 2003; 29(4):241–52.
103. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, et al. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(7):493–501.
104. Hill G, Kremenz E, Hill H: Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma. *Cancer* 1984, 53:1299-1305.

105. Atkins M, Lotze M, Dutcher J, Fisher R: High-dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of Clinical Oncology* 1999, 17(7):2105-2116.
106. Phan G, Attia P, Steinberg S, White D: Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2001, 19(15):3477-3482
107. Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med.* 2012 Mar 2;10(1):23
108. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M DJ, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, et al: Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 2011, 364(26):2517-2526
109. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 2010, 363(8):711-723.
110. Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(5):561.
111. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1239.
112. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364:2507
113. Topalian SL, Hodi S, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443.



**6. ARTIGO SUBMETIDO E ACEITO PARA PUBLICAÇÃO PARA CLINICAL AND  
EXPERIMENTAL DERMATOLOGY**

**GASTRIN-RELEASING PEPTIDE RECEPTOR (GRPR) EXPRESSION IN  
PATIENTS WITH CUTANEOUS MALIGNANT MELANOMA**

Marrone BF <sup>1,5</sup>, Meurer L <sup>2,4</sup>, Moretto A <sup>5</sup>, Kleina W <sup>3</sup>, Schwartzmann G <sup>1,3,4,5</sup>

1 Oncology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

2 Pathology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

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

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

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

## **Background**

The incidence of melanoma is increasing worldwide and the management of patients with disseminated disease is a difficult problem. Chemotherapy was the treatment of choice in metastatic melanomas for many decades; however this option produces disappointing results. Recently a better understanding about molecular events related to melanoma's carcinogenesis allowed the development of new drugs with molecular target.

Gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuroendocrine peptide shown to have growth-stimulatory effects on many types of cancer. Few data are available about GRPR expression in melanoma cells.

## **Aim**

The aim of this study was to determine the GRPR expression in cutaneous melanomas.

## **Methods**

Immunohistochemistry was performed on formalin –fixed paraffin-embeded samples of 51 cutaneous melanomas. Significant differences between GRPR expression regarding clinicopathologic features were done using exact Fisher's test.

## **Results**

GRPR immunoexpression was demonstrated in 42/51 (82,4%) of cutaneous malignant melanoma samples. It was strongly expressed in 30 (58,9%) of cutaneous melanomas. It was not detected a significant difference on GRPR expression regarding primary or metastatic lesions. We correlated the GRPR expression score with pathologic features associated with prognosis in cutaneous melanoma and it

was not detected a significant difference on GRPR expression regarding Clark,  $p=0,35$  and Breslow index,  $p=0,175$ .

### **Conclusion**

This study shows an elevated GRPR expression in melanoma tissue (82,4%). However, the study had a small sample size, and other studies are warranted to confirm our results and to improve the knowledge about the role of GRPR as another possible pathway in melanoma carcinogenesis.

### **Introduction**

Cutaneous malignant melanoma is the most lethal of the skin cancers and its worldwide incidence rate is increasing during last decades <sup>1</sup>.

Patients with unresectable metastatic disease exhibit a median survival of 6-12 months and a 5-year survival rate of less than 10%. For these patients, palliative radiation and systemic chemotherapy can be applied, but response rates are modest and of short duration <sup>2</sup>.

Recent advances in melanoma research have led to the identification of molecular oncogenic events that may contribute to melanoma initiation and progression. The activation of oncogenic signaling cascades by distinct growth factors and cytokines, acting through their specific receptors, are being recognized as the basis for the sustained proliferation, invasion and metastases. These deregulated gene products include B-Raf<sup>V600E</sup>, N-Ras<sup>Q61R</sup>, MEK, epidermal growth factor receptor (EGFR),

among others. The abnormal function of these oncogenic pathways can promote the acquisition of a more malignant behavior by melanoma cells <sup>3</sup>.

The B-raf inhibitor vemurafenib <sup>4</sup> is one example of molecular-targeted agent that interfere selectively in the some of the above mentioned pathways, leading to objective tumor regressions in patients with metastatic malignant melanoma.

Furthermore, new insights in tumor immunology have identified opportunities to enhance the recognition and destruction of melanoma cells by the immune system. The development of novel modulators of T-cell proliferation such as the CTL-4 receptor inhibitor antibody ipilimumab <sup>5</sup> is one of the promising experimental therapeutic strategies for the treatment of malignant melanoma.

The gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuroendocrine peptide shown to have growth-stimulatory effects on many types of cancer <sup>6,7</sup>. The GRP-preferring receptor (GRPR, BB2 receptor) belongs to the G-protein receptor super family and activates multiple signal transduction pathways, resulting in cell proliferation and growth <sup>8</sup>.

Over the last two decades, various lines of experimental evidence have demonstrated that GRP and other bombesin-like peptides (BLPs) may act as growth factors in many types of cancer <sup>6,7</sup>. For the above reason, GRPR antagonists have been developed as experimental anticancer agents, exhibiting significant antitumor activity both in vitro and in vivo in murine and human tumors <sup>9,10</sup>. The inhibition of GRPR was shown to also interfere with other growth factor signaling pathways, such as the EGF- and VEGF-dependent signaling pathways <sup>9,10</sup>.

RC-3095 is an example of a synthetic GRPR antagonist, which exhibited a favorable toxicity profile and antitumor activity in preclinical models. A phase I trial with RC-

3095 was conducted in patients with advanced malignancies, confirming its favorable toxicity profile <sup>11</sup>. In this context, the study of GRPR cell surface profile in human malignancies is of great importance, as it may help recognizing human cancer types expressing sufficient amounts of these receptors to be considered as therapeutic targets for the use of GRPR antagonists, such as RC-3095.

Considering that data on GRPR expression in malignant melanoma are scanty, the authors decided to determine its expression in tumor samples obtained from patients with cutaneous malignant melanoma treated at our institution.

## **Methods**

We identified 51 paraffin blocks of skin tumor biopsies of patients with malignant melanoma at the archives of the Department of Pathology of the Academic Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, registered between the years 2004 and 2009. The most representative sample from each lesion was identified by the pathology staff and submitted to immunohistochemical evaluation.

### ***Immunohistochemistry (IHC)***

IHC was performed on formalin-fixed paraffin-embedded samples of melanoma tissues. 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 µm 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kit DAB, Dako Staining).

### ***Assessment of Staining Patterns***

For each antibody, a pathologist scored staining intensity (0 = no staining; 1+ = weak staining; 2+ = moderate staining; 3+ = strong staining) of tumor areas. Specimens in which one or more tumor areas with different staining intensities were present were scored for the most prevalent intensity. Specimens with focal pattern of cell coloration (< 10% of cells) stained 1+, and those with diffuse pattern (>10% of cell) stained 3+. For data presentation, the specimens were classified similarly to Scott et al,<sup>12</sup> as follow: a) Negative: specimens whose intensity plus pattern were less or 1; b) Weak positive: specimens whose intensity plus pattern score were between 2 and 4; and c) Strong positive: specimens whose intensity and pattern scores were 5 or more.

### ***Statistical analysis***

Data were evaluated using SPSS 14.0. Correlation between GRPR expression and pathologic variables was evaluated using exact Fisher test. P < 0, 05 was considered significant.

### **Results**

Forty (78.4%) samples of cutaneous malignant melanoma were derived from primary skin lesions, while 11 (21.6%) cases were obtained from biopsies of metastatic sites. Of those, 7 out of 11 were derived from lymph nodes (63.6%) or visceral organs (36.4%).

GRPR expression was demonstrated in 42/51 (82.4%) of cutaneous malignant melanoma samples. It was weakly positive in 12 out of 51 cases (23.5%) and strongly positive in 30 out of 51 cases (58.9%). No expression was observed in the remaining 9 cases (17.6%). These results are summarized in Table 1.

In Figures 2 and 3, GRPR expression in tumor samples are illustrated. Positive cases are shown in Figure 2, while negative cases are exemplified in Figure 3. Using the Fisher Exact Test, no statistically significant difference was observed between the GRPR expression in primary or metastatic lesions.

We have also correlated the GRPR expression score with known pathologic indexes shown to be associated with disease prognosis in cutaneous melanoma, such as the Clark Level and the Breslow Index. Information about the Clark level and the Breslow Index was available in 26 and 14 out of 51 samples, respectively. No significant difference on GRPR expression in the tumor samples was demonstrated for these two pathologic indexes (Clark Level,  $p= 0.35$  and Breslow Index,  $p= 0.175$ ). These results are summarized in Table 2.

Fig 1 - Overall GRPR expression scores in cutaneous melanomas

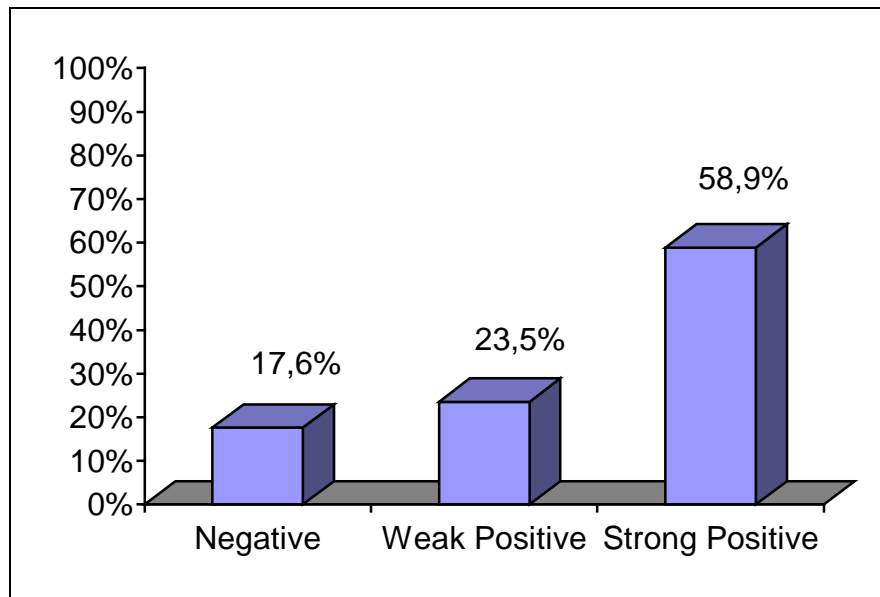


Fig 2- Antibody staining in GRPR positive melanoma tissues. (A) HE, (B) GRPR immunoexpression in melanoma strong positive staining x100, and (C) x 400.

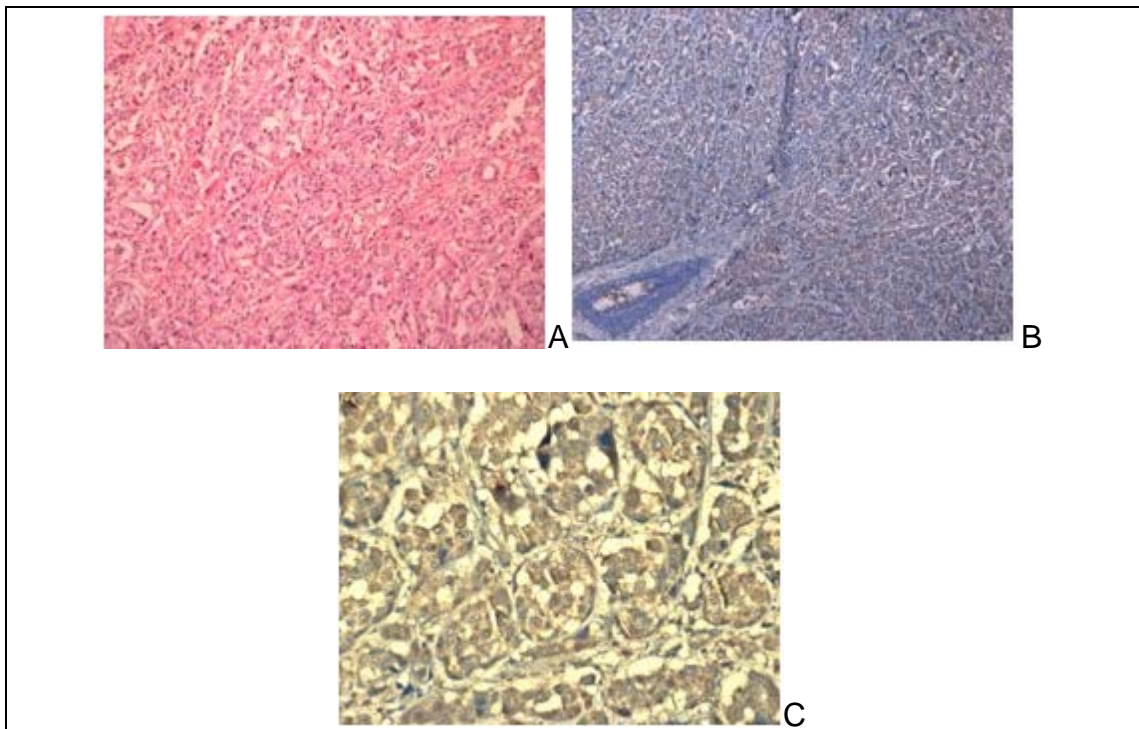
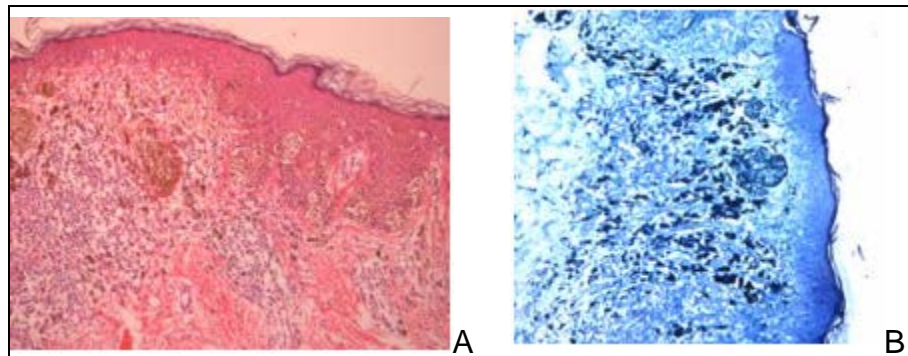




Fig 3- Antibody staining in GRPR negative melanoma tissues (A) HE, (B) GRPR immunoexpression in melanoma negative staining x200



## Tables

Table 1. - – GRPR expression in cutaneous melanoma according to Clark level

Pathologic Features	GRPR expression scores		
	Negative	Low positive	Strong positive
Clark (N=26)			
I and II (N=15)	3 (20%)	3 (20%)	9 (60%)
III, IV and V (N=11)	5 (45%)	2 (18,5%)	4 (36,5%)

P= 0,35

Table 2 - expression in cutaneous melanoma according to Breslow index

Pathologic features	GRPR expression scores		
	Negative	Low positive	Strong positive
Breslow index (N=14)			
I and II (N=11)	5 (45%)	3 (27,5%)	3 (27,5%)
III, IV, V (N=3)	0	0	3 (100%)

P=0,175

## Discussion

Bombesin is a 14-amino acid peptide initially isolated from frog skin<sup>13</sup>. GRP, a 27-amino acid homolog of frog bombesin, and bombesin share a highly conserved 7-amino-acid COOH-terminal sequence, which is required for immunogenicity and for high-affinity binding to the GRP-preferring receptor. Therefore, GRP and bombesin have essentially identical physiologic actions<sup>14</sup>.

Following the binding of GRP to its receptor, multiple cellular signal transduction pathways are activated, including mitogen-activated protein kinase, protein kinase C, tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, p130<sup>cas</sup> and calcium mobilization, resulting in cell proliferation and growth<sup>15</sup>.

GRP plays an important role in releasing gastrointestinal (GI) tract hormones, secreting pancreatic enzymes and regulating smooth muscle contraction, serving also as a neurotransmitter in the central nervous system<sup>14</sup>.

GRPR expression was studied in a variety of human malignancies. GRPR expression was shown in fresh-frozen specimens of prostatic carcinoma and benign prostatic hypertrophy<sup>16</sup>. Other researchers have found an overexpression of GRPR in invasive prostatic carcinomas and in the earliest phase of neoplastic transformation of the prostate<sup>17</sup>. In another study, 80 specimens of primary prostate cancer were evaluated by receptor binding assays, and 68% showed high affinity for GRPR<sup>18</sup>. The same authors reported on the GRPR expression in other tumors such as gastrinomas, small-cell lung carcinomas, renal cell carcinomas and breast carcinomas.

GRPR expression in breast cancer tissues showed 33 positive cases out of a series of 100 cases <sup>19</sup>. In another study, the authors evaluated GRPR expression in human non-neoplastic and neoplastic breast tissues. GRPR expression was detected in neoplastic epithelial mammary cells in 29 out of 46 invasive ductal carcinomas, in 11 out of 17 ductal carcinomas in situ, in 1 out of 4 invasive lobular carcinomas, in 1 out of 2 lobular carcinomas in situ and in 1 mucinous and 1 tubular carcinoma <sup>20</sup>. A heterogeneous GRPR distribution was observed in 61% of the invasive carcinomas and 63% of the carcinomas in situ. In this study, a ubiquitous GRPR expression in non-neoplastic human breast tissue was also demonstrated, indicating a role of GRP in breast physiology, and a high percentage of GRPR-positive neoplastic breast tissues.

In another study, human colorectal cancer tissue and matched normal mucosa from 21 patients were examined for the presence of GRP binding sites. There was no involvement of normal mucosa, whereas several tumor samples showed high affinity for GRPR <sup>21</sup>, supporting the possibility that GRP may act as an autocrine growth factor in colorectal cancer.

Most small-cell lung cancer (SCLC) tumors produce pro-gastrin-releasing peptide (pro-GRP), which can be used as a specific marker for this malignancy. GRPR was detected in 30% of tumor samples <sup>22</sup>. Furthermore, GRPR expression was also demonstrated in gastric adenocarcinomas. <sup>23</sup> squamous cell carcinoma of the head and neck <sup>24</sup>, and GI carcinoid tumors <sup>12</sup>, among others.

Data on GRPR expression in human cutaneous malignant melanoma are very limited. To the best of our knowledge, there is one published series that demonstrates GRPR expression in biopsy material from patients with malignant melanoma using immunohistochemistry <sup>25</sup>. In the study, 43% of tumor samples

showed GRPR expression, positive staining being observed regardless of the Clark Level.

Our series is the second to report on GRPR expression in patients with cutaneous malignant melanoma in published literature. Notably, using a similar technique, our results confirm the presence of GRPR in human malignant melanoma and also demonstrate a much higher GRPR expression in the tumors (82%) than the initial series. Of those cases, 58.9% showed a strong level of GRPR expression.

In our study, no differences were documented between the GRPR expression in primary and metastatic lesions. Unfortunately, we could retrieve information about the Clark Level and Breslow Index in only a limited number of cases, which place our results on the lack of significant differences in GRPR expression among patients with distinct Clark levels or Breslow indexes pending future analyzes.

In conclusion, our study confirms the single previous report of the presence of GRPR receptors in biopsy samples of patients with human malignant melanoma. It also shows that GRPR receptors are strongly over-expressed in more than 50% of the cases. Although limited by a sample size, our results suggest that patients with advanced malignant melanoma might be potential candidates to be considered for inclusion in future clinical trials with GRPR antagonists, specially those with a favorable safety profile, as it is the case of RC-3095. Further studies on this subject are warranted.

## References

1. Geller AC , Muler DR, Annas GD, et al. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. JAMA 2002; 288:1719.
2. Hill G, Krementz E, Hill H. Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma. Cancer 1984, 53:1299-1305.
3. Rofstad EK, Halsør EF. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. Cancer Res. 2000;60:4932-4938.
4. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med 2010; 36:809
5. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. The New England journal of medicine. 2010;363(8):711–723.
6. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. Ann Oncol 2007; 18: 1457–1466.
7. Flores DG, Meurer L, Uberti AF, et al: Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. Brain Res Bull 2010; 82: 95–98.
8. Benya RV. Glycosilation of the gastrin-releasing peptide receptor and its effect on expression, G protein coupling, and receptor modulatory process. Mol Pharmacol. 2000 Dec; 58(6): 1490-501

9. Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 2004;90(1):245-252
10. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, et al. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10913-10918.
11. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006;24(5):403-412
12. Scott N, Millward G, Cartwright EJ, et al. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumors. *J. Clin. Pathol*, v.57, p.189-92, 2004.
13. Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alitysin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alityes*. *Experientia* 1971;27:16-7.
14. Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, et al. Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest* 1988;59:5-24.
15. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, et al. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 1999;18(8):2137–2148.
16. Logothetis C, Hoosein N. The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 1992;16H:128-134.

17. Bartholdi MF, Wu JM, Pu H, Troncoso P. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79(1):82-90.
18. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985;316:823-826
19. Gugger M, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 1999;155(6):2067-2076.
20. Halmos G, Wittliff JL, Schally AV. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Res* 1995;55(2):280-287.
21. Carroll RE, Matkowskyj KA, Chakrabarti S, et al. Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated colon cancers in humans. *Am J Physiol* 1999;276:G655-G665. (3 Pt 1).
22. Uchida K, Kojima A, Morokawa N, et al. Expression of progastrin-releasing peptide and gastrin-releasing peptide receptor mRNA transcripts in tumor cells of patients with small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128(12):633-640.
23. Carroll RE, Carroll R, Benya RV. Characterization of gastrin-releasing peptide receptors aberrantly expressed by non-antral gastric adenocarcinomas. *Peptides* 1999;20(2):229-237.
24. Lango MN, Dyer KF, Lui VW, et al. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nat Cancer Inst* 2002;94(5):375-383.
25. Charitopoulos K, Lazaris A, Aroni K. Immunodetection of gastrin-releasing peptide in malignant melanoma cells. *Melanoma Research* 2000, 10: 395-400.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A observação da elevada expressão de GRPR em materiais de biópsia de pacientes portadores de MM foi informação fundamental na decisão de incluirmos este tipo de neoplasia em ensaios clínicos de fase II com o antagonista de GRPR RC-3095. Estes ensaios estão programados para terem o seu início no primeiro semestre de 2013. Durante esta nova fase de estudos clínicos, será considerado critério de exclusão a ausência de expressão destes receptores no material de biópsia confirmatória da neoplasia.

Paralelamente, é nossa intenção ampliar os estudos da expressão de GRPR em amostras de MM cutâneo, para aumentarmos o poder estatístico da análise de subgrupos. Serão também incluídas amostras de MM de origem ocular.



## 8 ANEXOS

### **Anexo A. Técnica da Imuno-histoquímica**

A análise da expressão do GRPR foi feita utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica, utilizando um anticorpo anti-GRPR policlonal de coelho correspondente á segunda alça extracelular (nº de catálogo OPA1-15619, Affinity Bioreagents, Golden, Co, USA), na diluição 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 4º C, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetrahydroclorido (Kit DAB, Dako). Um corte de carcinoma de pâncreas foi utilizado como controle positivo e, para controle negativo foi omitida a utilização do anticorpo primário.

## **Anexo B. Quantificação dos resultados**

Intensidade:

0: sem coloração

1: fraca

2: moderada

3: forte

Distribuição

1: menos de 10% das células coradas (padrão focal)

3: mais de 10% das células coradas (padrão difuso)

Quando mais de um padrão de expressão estava presente na amostra foi considerado aquele mais prevalente.

Para apresentação dos dados as lesões foram classificadas da seguinte forma:

- Negativas: lesões com soma de intensidade menor ou igual a 1.
- Positivas fracas: lesões com soma de intensidade e distribuição entre 2 e 4.
- Positivas fortes: lesões com soma de intensidade e distribuição maior ou igual a 5.

### **Anexo C. Demais resultados não contidos no artigo**

1. Características adicionais da amostra constituída por 40 lesões primárias de MM cutâneo (excetuadas as 11 lesões que provinham de metástases de MM):

Na amostra incluindo as 40 lesões primárias, havia especificação do tipo histológico em metade dos casos, sendo 4 amostras de melanoma *in situ*, 15 de tipo espalhamento superficial, 1 de tipo nodular e 1 melanoma acral. Não foi realizada correlação entre os tipos histológicos e a expressão de GRPR devido ao pequeno número de amostras com características patológicas conhecidas e a pouca representatividade de cada grupo.

Quanto ao gênero, a amostra foi composta de 23 homens e 17 mulheres. Tumor ulcerado foi descrito em uma amostra e ausência de ulceração em 16, sendo que em 23 amostras esse dado não foi estabelecido. Dados relativos à presença de regressão espontânea do tumor, invasão vascular e perineural e índice mitótico foram descritas na minoria dos casos, não sendo possível realizar análise estatística com base nestes achados patológicos quanto à expressão de GRPR.

2. Expressão de GRPR em amostras de pele normal e nevos melanocíticos

Foram realizadas colorações para GRPR em um grupo controle adicional incluindo amostras de nevos melanocíticos (6) e pele normal (3). Deve-se destacar que todas as amostras provenientes de nevos melanocíticos foram negativas para expressão de GRPR. Quanto às amostras de pele normal, verificou-se expressão classificada como positiva fraca no epitélio escamoso em duas delas, com

negatividade na derme. A outra amostra foi negativa em toda a sua espessura. A observação de que nevos melanocíticos foram negativos para a expressão de GRPR merece atenção especial, uma vez que estas lesões são usualmente utilizadas na literatura como controles negativos para estudos de marcadores moleculares em MM. Esta marcada diferença de expressão de GRPR entre nevos melanocíticos e MM podem dar suporte à hipótese de que este alvo molecular possa ser modulado em futuros estudos com agentes bloqueadores da sinalização por GRPR.

Figura 6. Coloração de imuno-histoquímica demonstrando expressão negativa para GRPR em nevo melanocítico – aumento de 400x

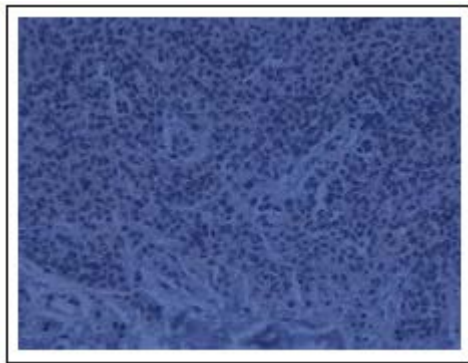


Figura 7. Coloração de imuno-histoquímica demonstrando expressão de GRPR positiva fraca no epitélio escamoso e negativa na derme de pele normal – aumento de 200x

