

**ESTUDO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM CÂNCER DE VULVA: VALIDAÇÕES
A PARTIR DE RESULTADOS DE CGH ARRAY**

ERICA MIE AKAGI DA SILVA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Akagi da Silva, Erica Mie

Estudo de genes diferencialmente expressos em câncer de vulva: validações a partir de resultados de CGH array / Erica Mie Akagi da Silva – São Paulo, 2015.

98p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. CÂNCER VULVAR. 2. PROGNÓSTICO. 3. QUINASES ASSOCIADAS A RHO/análise. 4. PROTEÍNAS RHO DE LIGAÇÃO AO GTP/análise. 5. HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA. 6. ESTUDOS DE VALIDAÇÃO COMO ASSUNTO

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”.

1 Coríntios 13.2

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida família por concretizarmos mais esta
etapa da vida.

Dedico também a todos aqueles que idealizam, de alguma forma, fazer a
diferença para a vida das pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me proporcionar trilhar mais esta etapa, por poder conquistar objetivos almejados e enfrentar obstáculos árduos e, principalmente, por me permitir uma nova vida.

Ao meu marido e amor da minha vida, Rafael, pelo carinho, dedicação e paciência durante todos esses anos dedicados a pesquisa. Por me apoiar a cada decisão tomada, a cada feriado e final-de-semana perdido, a cada alegria e frustração compartilhada. Obrigada pelo seu amor.

Aos meus queridos pais, Carmen e Akagi, que sempre foram exemplos de amor e dedicação, deram-me a melhor herança que poderiam me proporcionar: a educação. Amor eterno.

À minha irmã e melhor amiga, Cristiane, por demonstrar seu amor mesmo à distância.

Agradeço ao Dr. Rafael Malagoli Rocha pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho. Sou muito grata por me auxiliar na conquista desta etapa.

Ao A.C.Camargo Cancer Center por proporcionar a execução deste trabalho e pelo desenvolvimento intelectual. Às instituições de fomento à pesquisa CAPE e FAPESP por prover uma bolsa de estudo e auxílio financeiro.

Agradeço a todos os colegas do grupo e do CIPE pelo auxílio durante esta trajetória. Às minhas amigas Beatriz Maia e Beatriz Nunes pela revisão e auxílio durante este projeto, e por tornar o caminho mais agradável. Agradeço também ao amigo André Lavorato por proporcionar conhecimento e grande auxílio para a execução deste trabalho.

À Dra. Aline Damascena pela revisão e apoio estatístico.

Aos membros e funcionários do departamento de Patologia e Patologia Investigativa do Hospital A.C.Camargo, em nome do Dr. Fernando Augusto Soares, Ivan, Carlinhos, Severino, Marina, pelo fornecimento de materiais e conhecimento para a execução deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Biobanco, SAME e Biblioteca, pela assistência durante todo o período deste doutorado.

Agradeço aos membros componentes da banca de doutorado pela disponibilidade para a correção desta tese e por agregar novos conceitos para a melhoria da mesma.

RESUMO

Akagi da Silva EM. **Estudo de genes diferencialmente expressos em câncer de vulva: validações a partir de resultados de CGH array.** São Paulo; 2015 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma de vulva é um tumor de baixa ocorrência, sendo responsável por menos de 3% de todos os tumores malignos que acometem mulheres. Em mulheres jovens a ocorrência da doença está atrelada a fatores de risco como tabagismo e infecção por HPV, entretanto em mulheres acima dos 50 anos ocorre por mecanismos genéticos ainda pouco elucidados. Nos últimos anos poucos autores estudaram alterações genômicas em carcinomas vulvares, contudo nenhum deles determinou um fator prognóstico definitivo, nem tampouco correlacionou esses achados com a expressão gênica, mesmo representando pontos-chave na compreensão do processo de carcinogênese. A partir da análise de arranjos de hibridação genômica comparativa (CGH-array) realizada previamente em nosso laboratório, dois genes candidatos, *ROCK1* e *RhoD*, localizados em regiões com alta frequência de ganhos em nossas amostras de neoplasias vulvares, foram selecionados para este estudo. **Objetivo:** Validar a expressão dos genes candidatos, *ROCK1* e *RhoD*, que foram identificados em regiões com ganho de cópias nas amostras de carcinoma vulvar pelo método de CGH-array, a fim de determinar melhores e mais acurados valores prognósticos no carcinoma vulvar. **Métodos:** Os 16 casos submetidos ao estudo de CGHa foram resgatados do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center para a validação por PCR em tempo real. Imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada em 96 casos (análise da expressão de *ROCK1*) e em mais 150 amostras de carcinomas vulvares (análise da expressão de *RhoD*) provenientes dos Arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, empregando-se os protocolos dos kits Advance (DAKO) e Novolink (Leica), respectivamente. Todas as lâminas de IHQ foram digitalizadas e

analisadas utilizando um sistema de imagem. O extrato proteico das linhagens de células tumorais de vulva humana (SW954 e SW962) foi submetido a gel SDS-PAGE 10% e, após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi sujeita a técnica de Western blot para determinar a expressão basal do anticorpo RHOD nas linhagens celulares. Os dados gerados foram submetidos a testes estatísticos através do software SPSS Statistics 20 (IBM) correlacionando-os aos principais dados clínicos das pacientes. **Resultados:** A expressão de ROCK1 por qRT-PCR em tecido normal foi maior quando comparada com as amostras de tumor ($p = 0,016$). Por IHQ, a maior expressão de ROCK1 foi associada com a ausência de metástase linfonodal ($p = 0,022$) e menor profundidade de invasão ($p = 0,002$). Além disso, os níveis mais elevados de ROCK1 foram correlacionados com uma maior sobrevida livre de doença ($p = 0,001$). A perda de ROCK1 foi independentemente associada a pior sobrevida específica por câncer ($p = 0,0054$) determinada por meio da análise multivariada. A expressão de RhoD por RT-PCR foi maior em amostras tumorais do que em amostras normais. Através da técnica de IHQ, verificou-se que o aumento da expressão de RhoD foi associado estatisticamente com a ausência de invasão perineural, vascular e linfática ($p=0,014$ e $p=0,041$, respectivamente). RhoD aumentado também foi relacionado a menor profundidade de invasão ($p=0,001$). A expressão aumentada de RhoD foi associada com melhor sobrevida global e livre de doença ($p=0,013$ e $p=0,036$, respectivamente).

SUMMARY

Akagi da Silva EM. **[Study of differentially expressed genes in vulvar cancer: results from the validation of array CGH]**. São Paulo; 2015 [Doctoral Thesis - Antonio Prudente Foundation].

Introduction: The vulvar carcinoma is a low occurrence tumor, accounting for less than 3% of all malignant tumors that affect women. In young women the occurrence of the disease is linked to risk factors such as smoking and HPV infection, but the majority of cases of vulvar cancer occurs in women over 50 years by genetic mechanisms still poorly understood. Recently, few authors studied genomic changes in vulvar carcinomas, however none of them determined on prognostic factor, nor correlate these findings with gene expression, even representing key points in understanding the carcinogenesis process. From the analysis of comparative genomic hybridization arrays (array CGH) previously performed in our laboratory, two candidate genes, ROCK1 and Rhod, located in regions with high frequency gains in our samples of vulvar cancer were selected for this study. **Objective:** To validate the expression of the candidate genes, RhoD and ROCK1, which have been identified in regions with a gain of copies in vulvar carcinoma samples by CGH-array method, in order to determine the best and most accurate prognostic values in vulvar carcinoma. **Methods:** 16 cases of vulvar cancer were rescued from AC Camargo Cancer Center's Biobank for evaluation by RT-PCR. Immunohistochemistry (IHC) was performed in 96 (ROCK1 analyze the expression) and 150 (to quantify the expression of RhoD) samples of vulvar carcinomas from the Archives of Anatomic Pathology Department of the A.C. Camargo Cancer Center, using the protocols of Advance kits (DAKO) and Newlink (Leica), respectively. All IHC slides were scanned and analyzed using an imaging system. Protein extract of tumor cell lines of human vulva (SW954 and SW962) was added to SDS-PAGE 10% gel, and after electrophoresis, proteins were transferred to a

nitrocellulose membrane, which were added to Western blot technique to determine the baseline expression of RHOD antibody on cell lines. The data generated were subjected to statistical tests by SPSS Statistics software 20 (IBM) correlating them with the main clinical data of patients. **Results:** The expression of ROCK1 by qRT-PCR in normal tissues was higher when compared with tumor samples ($p = 0.016$). For IHC, most ROCK1 expression was associated with the absence of lymphatic metastases ($p = 0.022$) and a smaller depth of invasion ($p = 0.002$). Furthermore, ROCK1 higher levels were correlated with increased disease-free survival ($p = 0.001$). ROCK1 loss was independently associated with a worse cancer specific survival ($p = 0.0054$) determined by multivariate analysis. The expression of RhoD RT-PCR was higher in tumor samples than in normal samples. Through the IHC technique, it has been found that increased expression of RhoD was statistically associated with the absence of perineural invasion, vascular and lymphatic ($p = 0.014$ and $p = 0.041$, respectively). RhoD increased was also related to lower depth of invasion ($p = 0.001$). Increased expression of RhoD was associated with better overall and disease-free survival ($p = 0.013$ and $p = 0.036$, respectively).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais tipos histológicos no câncer de vulva	7
Figura 2	Respostas celulares acionadas por ROCK	27

Artigo 1

Figure 1	ROCK1 mRNA and protein are overexpressed in normal tissue	59
Figure 2	Immunohistochemical staining of ROCK1 in vulva carcinoma	60
Figure 3	Association between clinicopathological features and ROCK1 in vulvar carcinoma	61
Figure 4	Kaplan-Meier survival curves for ROCK1 staining	62
Figure 5	Representative image of aCGH analysis of chromosome 18 with emphasis on ROCK1	64

Artigo 2

Figure 1	RhoD mRNA and protein expression in Normal versus Tumor Samples	84
Figure 2	Specificity of the anti-RhoD antibody by Western blot	85
Figure 3	Immunohistochemical staining of RhoD in vulva carcinoma	86
Figure 4	RhoD immunostaining in vulvar carcinomas	87
Figure 5	Overall, recurrence-free and specific cancer survival curves for RhoD staining	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estadiamento FIGO para carcinoma de vulva	14
Quadro2	Estadiamento TNM para carcinoma de vulva	16

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1	Multivariate analysis of ROCK1 expression and clinicopathological characteristics in patients with vulvar SCC	63
----------------	---	----

Artigo 2

Table 1	Clinicopathological data and HPV infection status from vulvar squamous cell carcinoma patients	83
----------------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHK	Baby Hamster Kidney Cells
CDC42	Cell Division Cycle 42
CEC	Carcinoma de células escamosas da vulva
CGH	Hibridação Genômica Comparativa
CNA	Número de Cópias Somáticas
CNV	Número de Cópias Germinativas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
eIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 E
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
HPV	Papilomavírus Humano
IGCS	International Gynecologic Cancer Society
IHC	Imunohistochemistry
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIMK	LIM domain kinase
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MLC	Canais Leves de Miosina
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS-MLPA	Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mTOR	Mechanistic Target of Rampamycin
MYPT-1	subunidade MLC fosfatase
NCI	National Cancer Institute
ORF	Open Reading Frames
PBS	Tampão fosfato-salino
PTEN	Fosfatase e homólogo de angiotensina

RAB5	Member RAS oncogene family
RAC	Ras-related protein Rac
RHO	Ras Homolog Gene Family
RNA	Ácido ribonucleico
RND	Ribonuclease D
ROCK1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
siRNA	Small Interfering RNA
TMSB10	Thymosin beta 10
TNM	Size/extent of the primary tumor (T), number of regional lymph nodes (N), metastasis - cancer staging system
TP73	Tumor Protein p73
VIN	Vulvar intraepithelial neoplasia
VSCC	Vulvar squamous cell carcinoma

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Anatomia da Vulva	2
1.2	Câncer de Vulva	3
1.2.1	Etiologia	5
1.2.2	Tipos de Câncer de Vulva	7
1.2.3	Carcinoma de Células Escamosas.....	8
1.2.4	Fatores de Risco	8
1.2.5	Sintomas	11
1.2.6	Diagnóstico.....	12
1.2.7	Estadiamento.....	13
1.2.8	Disseminação	16
1.2.9	Tratamento	17
1.3	Alterações Genômicas e Epigenéticas em Carcinomas Vulvares	19
1.4	Motilidade Celular.....	22
1.5	RHO GTPases.....	24
1.6	Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase1 (ROCK1).....	26
1.7	Ras Homolog Family Member D (RHOD).....	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	ARTIGOS	34
3.1	Artigo 1: “ <i>ROCK1 as a novel prognostic marker in vulvar câncer</i> ”.....	34
3.2	Artigo 2: “ <i>Small Rho GTPase, RhoD, related as a good prognostic marker in vulvar cancer</i> ”	65
4	CONCLUSÕES	90
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

INTRODUÇÃO

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA DA VULVA

A genitália externa feminina ou a vulva compreende o monte púbico, grandes e pequenos lábios, clitóris, vestíbulo, bulbo vestibular e a glândula vestibular maior (THIBODEAU e PATTON 2007; STANDRING et al. 2008).

O monte púbico é um monte de tecido adiposo sobre a sínfise púbica. Os grandes lábios são dobras de pele cobertas com pele pigmentada lisa e pêlos na superfície externa. Cada grande lábio é composto principalmente de tecido adiposo e conjuntivo, com numerosas glândulas sudoríparas e sebáceas na superfície interna. Os pequenos lábios são duas dobras cutâneas pequenas da mucosa vulvar, desprovidos de tecido adiposo, situados entre os grandes lábios. São compostos por tecido conjuntivo permeado por fibras elásticas e cobertos por epitélio pavimentoso estratificado com uma camada de células escamosas na superfície (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004). Na área entre os pequenos lábios encontra-se o vestíbulo (THIBODEAU e PATTON 2007; STANDRING et al. 2008). O clitóris é um pequeno órgão composto por tecido erétil, localizado próximo à junção dos pequenos lábios. Glândulas vestibulares maiores (ou glândula de Bartholin) consistem em duas pequenas estruturas amarelo-avermelhadas, redondas ou ovais, que ladeiam o intróito vaginal, em contato com a extremidade posterior do bulbo vestibular. As glândulas são

compostas de tecido túbulo-acinar. As células secretoras são colunares e secretam muco claro ou esbranquiçado, com propriedades lubrificantes (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004; THIBODEAU e PATTON 2007; STANDRING et al. 2008).

A vulva é uma região muito suscetível a diversas lesões, como lesões traumáticas, doenças sexualmente transmissíveis e tumores benignos e malignos (CINTRA e MARTINS 1999). Possivelmente, essas lesões são causadas por frequentes traumas, susceptibilidade a infecções recorrentes e secreções oriundas de regiões próximas.

1.2 CÂNCER DE VULVA

Câncer vulvar é um raro tumor, representando aproximadamente 3 a 5% das malignidades do trato genital feminino (FIGUEIREDO 2004; BAIOCCHI e ROCHA 2014; HACKER 2009; DE MELO MAIA et al. 2012) e 1% de todos os tumores malignos em mulheres (FIGUEIREDO 2004), com uma incidência de 2-3 por 100.000 mulheres (WOELBER et al. 2011).

No Brasil, o câncer de vulva é o quarto câncer ginecológico mais incidente e, de acordo com o INCA, corresponde a 3,2% dos cânceres ginecológicos atendidos. Em 1992, Recife foi considerada a cidade com maior incidência no mundo, com 5,6 casos por 100.000 mulheres/ano (DE MELO MAIA et al. 2012).

Segundo o *National Cancer Institute*-NCI (2014) a incidência de novos casos entre 2007 a 2011 foi de 2,4 casos por 100.000 mulheres e o

número de mortes de 0,5 casos por 100.000 mulheres. Nos Estados Unidos, estima-se que 4.850 mulheres serão diagnosticadas, perfazendo um total de 0,3% de novos casos, e aproximadamente 1.030 mulheres morreram de câncer de vulva em 2014. Entre 2004 e 2010 a porcentagem de sobrevivida em 5 anos foi de 70,5%.

A incidência *in situ* aumenta entre 40 a 49 anos de idade e depois diminui, enquanto que o risco de câncer invasivo aumenta com a idade, mais rapidamente depois dos 50 anos (HACKER 2009).

Nas últimas décadas houve um significativo aumento na incidência de neoplasia intraepitelial vulvar (VIN), principalmente em mulheres mais jovens, relacionadas com a mudança do comportamento sexual, infecção por papilomavirus (HPV) e fumo (HACKER 2009). As VINs são consideradas lesões precursoras em alguns casos (RICCI et al. 2008).

O câncer de vulva é provavelmente multifatorial, sendo correlacionado com o acometimento em populações de baixa renda e idosas por todo o mundo, levando à hipótese de que a higiene íntima inadequada e cuidados médicos precários (FIGUEIREDO 2004).

A morbidade após a cirurgia do câncer de vulva é alta. A disfunção sexual e problemas psicossociais são as complicações mais comumente relatadas após a cirurgia da vulva (WILLS e OBERMAIR 2013). Por isso, um tratamento mais específico e adequado para cada paciente é necessário, contando sempre com um acompanhamento multidisciplinar para melhorar a qualidade de vida dessas pacientes.

1.2.1 Etiologia

Não há fator etiológico específico identificado para câncer de vulva, e a relação da doença invasiva para a distrofia vulvar e neoplasia intraepitelial da vulva é controversa. Prurido crônico é geralmente um importante fenômeno antecedente em paciente com câncer vulvar (HACKER 2009).

O câncer de vulva ocorre principalmente em mulheres acima dos 60 anos de idade. Entretanto, houve um aumento na frequência da VIN de alto grau nas últimas décadas, principalmente entre mulheres mais jovens (40 a 60 anos de idade). VIN é considerada como tendo um baixo potencial de malignidade, com progressão para doença invasiva mais provável em idosos ou imunodeprimidos. A positividade por HPV é reportada em 20% a 60% das pacientes com câncer vulvar (HACKER 2009; KUMAR et al. 2008).

Existem duas vertentes biológicas distintas em relação à etiologia do câncer vulvar: um tipo é visto principalmente em pacientes jovens, está relacionado com infecção por HPV e tabagismo, e é comumente associado com VIN clássica, como basalóide e verrucosa. Geralmente nestas mulheres alterações *in situ* (VIN) restritas ao epitélio precedem o desenvolvimento do câncer propriamente dito. A VIN pode ser encontrada em focos múltiplos separados ou pode coexistir com uma lesão invasora. Há evidência de que, ao menos em algumas pessoas, a VIN esteve presente por muitos anos, talvez décadas. O HPV, principalmente o tipo 16, está presente em 75% a 90% dos casos. Em muitos casos há a coexistência de carcinoma vaginal ou cervical, carcinoma *in situ* ou condiloma acuminado, sugerindo um agente causal comum, provavelmente o HPV. Não está claro

se influências genéticas, imunológicas ou ambientais (p. ex., tabagismo ou superinfecção com novos tipos de HPV) determinam o seu curso (KUMAR et al. 2008; HACKER 2009).

O outro subgrupo, o tipo mais comum, é visto principalmente em pacientes idosas, não relacionado com o tabagismo ou infecção por HPV. É muitas vezes precedido por anos de alterações epiteliais não-neoplásicas, incluindo líquen escleroso e, raramente, líquen simples crônico, adjacente ao tumor. Frequentemente o epitélio não apresenta as alterações citológicas típicas da VIN, contudo ele pode apresentar células disceratóticas e queratinização basal. A VIN, quando presente, é do tipo diferenciada (ou simplex) e está situada adjacente ao câncer invasivo. (KUMAR et al. 2008; HACKER 2009).

A VIN diferenciada (não relacionada ao HPV) e os carcinomas vulvares precoces aparecem como áreas de leucoplasia causadas pelo espessamento epitelial que envolve qualquer região da vulva ou da pele adjacente. Com o passar do tempo, estas áreas evoluem para tumores exofíticos ou tumores endofíticos ulcerativos (KUMAR et al. 2008).

Os tumores positivos para o HPV são, mais frequentemente, multifocais e apresentam-se verrucosos ou condilomatosos. Histologicamente, as neoplasias em pacientes positivas para o HPV tendem a ser carcinoma de células escamosas pouco diferenciados, enquanto as lesões em pacientes negativas para o HPV, que geralmente são unifocais, tendem a mostrar células escamosas queratinizadas bem diferenciadas (KUMAR et al. 2008).

1.2.2 Tipos de Câncer de Vulva

O câncer de vulva pode surgir a partir de seus componentes: células de epiderme, melanócitos, glândulas sudoríparas e sebáceas, glândulas de Bartholin, células neurais e musculares (FIGUEIREDO 2014).

O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas (CEC), que acomete aproximadamente 90% dos casos. Os melanomas, adenocarcinomas, carcinomas de células basais e sarcomas são menos frequentes (FIGUEIREDO 2014; RICCI et al. 2008) (Figura 1).

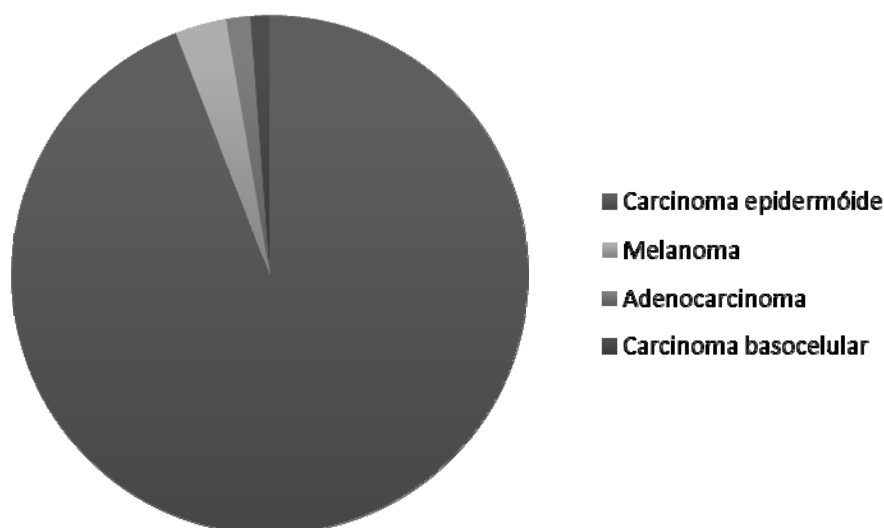


Figura 1 – Principais tipos histológicos no câncer de vulva

Existem ainda os tipos histológicos a considerar: adenocarcinoma não especificado; carcinoma da glândula de Bartholin; carcinoma verrucoso; doença de Paget da Vulva.

1.2.3 Carcinoma de Células Escamosas

O carcinoma de células escamosas ou epidermóides (CEC ou SCC) é predominantemente uma doença de mulheres pós-menopausadas, com média de idade de aproximadamente 65 anos (RICCI et al. 2008; HACKER 2009). Em sua forma invasiva, essa variedade de câncer de vulva é relativamente incomum, representando cerca de 4% dos tumores ginecológicos (RICCI et al. 2008).

A maioria dos carcinomas escamosos vulvares ocorre no lábio maior, no lábio menor, clitóris e o períneo (HACKER 2009).

Os carcinomas escamosos ceratinizantes são categorizados de acordo com a sua diferenciação histológica:

CEC1 ou CEC bem diferenciado: frequentemente associado à VINs diferenciadas e dermatoses inflamatórias. Apresenta em sua camada basal atipia leve a moderada, com diminuição da atipia com a maturação.

CEC2 ou CEC moderadamente diferenciado: frequentemente associado à VIN clássica e HPV. Apresenta camadas de células neoplásicas imaturas com alta relação núcleo-citoplasma.

CEC3 ou CEC pouco diferenciado: Também é associado à VIN clássica e HPV e exibe as camadas de células neoplásicas imaturas. (CRUM e GRANTER 2006).

1.2.4 Fatores de Risco

O aumento do número de casos de câncer de vulva nas últimas décadas pode ser explicado pelo aumento da expectativa de vida e pela

exposição a fatores de risco (FIGUEIREDO 2004). Os fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença relacionam-se a aspectos comportamentais, reprodutivos, hormonais e genéticos (PINTO 2002).

Dentre os fatores de risco tipicamente relacionados incluem-se infecção por papilomavírus humano (HPV), tabagismo, VIN (PINTO 2002; FIGUEIREDO 2004; WOELBER et al. 2011).

Outros fatores epidemiológicos também foram associados: como carcinomas genitais, doenças imunossupressoras crônicas (como HIV), doenças crônicas de pele na vulva, diabetes, obesidade, hipertensão (PINTO 2002; FIGUEIREDO 2004).

O HPV

Os papilomavírus são classificados de acordo com a sua homologia na sequência de nucleotídeos. As regiões codificadoras (ORF, open reading frames) são divididas nas sequências precoce (ou early, E) e tardia (ou late, L). Os produtos dos genes E estão envolvidos no controle da replicação do DNA viral e da expressão do gene viral. Os genes tardios são expressos na fase final da infecção e estão envolvidos na síntese de proteínas estruturais (FIGUEIREDO 2004).

A infecção por HPV requer a disponibilidade de células epiteliais epidermais ou de mucosa que ainda são capazes de proliferar. Nestas células, a expressão do gene viral é suprimida, mesmo com a expressão dos genes virais E limitadas (como E5, E6 e E7), resultando no aumento da proliferação das células infectadas e sua expansão lateral. Em seguida, na

entrada da camada suprabasal, a expressão do gene viral L é iniciada; o genoma viral circular é então replicado e há a formação de proteínas estruturais. Nas camadas superiores da epiderme ou da mucosa, partículas virais são montadas e liberadas (ZUR HAUSEN 2002).

Três genes possuem atividade estimulatória proliferativa: E5, E6 e E7. E5 é associada à prevenção da apoptose após danos ao DNA. As principais funções na transformação maligna têm sido atribuídas aos genes E6 e E7, cujos tipos são HPV 16 e 18 e suas proteínas. Eles são frequentemente expressos em tecidos alterados e são capazes de imortalizar vários tipos de cultura de células humanas (ZUR HAUSEN 2002).

A entrada do vírus nas células gera duas categorias de alterações morfológicas: a infecção produtiva e o distúrbio de maturação (FIGUEIREDO 2004).

A infecção produtiva caracteriza-se, em células escamosas, pelo efeito citopático, sem capacidade de divisão celular, correspondente à coilocitose clássica, distinguida por cariomegalia, hipercromasia, irregularidades no contorno nuclear, multinucleação e amplo halo claro perinuclear com reforço citoplasmático periférico. Há discreta proliferação de células basais (FIGUEIREDO 2004).

Os distúrbios de maturação estão associados aos produtos dos genes E6 e E7, promovendo a imortalização das células (FIGUEIREDO 2004).

A infecção por HPV é conhecida como uma importante causa de câncer no colo uterino e no carcinoma epidermóide (SIRIAUNGUL et al. 2014).

No carcinoma vulvar, a prevalência da infecção por HPV é descrita entre 40 a 65% dos casos, considerada baixa quando comparada a prevalência de outros tumores, como no câncer anal (90,8%) e câncer vaginal (69,9%) (SIRIAUNKGUL et al. 2014).

RODRIGUES et al. (2013) descrevem que, em sua casuística, 39,1% dos casos de VSCC eram positivos para HPV, destes 35,3% eram HPV de alto risco (HPV 16). As amostras HPV positivas foram associadas a melhor sobrevida em carcinoma vulvar (RODRIGUES et al. 2013).

Acredita-se que a implementação da vacina profilática contra HPV resultará em uma diminuição significativa na incidência de câncer vulvar invasivo e *in situ* relacionados ao HPV, particularmente em mulheres jovens (HACKER 2009).

1.2.5 Sintomas

Os sintomas do câncer vulvar são escassos e tardios. Muitas vezes o seu diagnóstico somente poderá ser realizado através de vulvoscopia e biópsia (FIGUEIREDO 2004; HACKER 2009; RICCI et al. 2011).

Os sinais mais comuns podem incluir prurido vulvar, dor localizada, sangramento e ulceração (HACKER 2009).

A maioria apresenta um nódulo ou massa vulvar, embora haja uma longa história de pruridos, geralmente associado à distrofia vulvar. Ocasionalmente, uma grande massa metastática na virilha pode ser sintoma presente inicial.

No exame físico, a lesão é geralmente elevada e pode ser avermelhada, ulcerada, leucoplásica ou aparência verrucosa. Lesões semelhantes a verrugas são muitas vezes diagnosticadas inicialmente como condiloma acuminado (HACKER 2009).

1.2.6 Diagnóstico

Diversos elementos devem ser usados para estabelecer o diagnóstico: histórico clínico e um exame clínico cuidadoso, as medidas do tumor, avaliação da extensão da mucosa adjacente e envolvimento linfonodal, são imprescindíveis para o planejamento do tratamento (FIGUEIREDO 2004; MOORE et al. 2009).

De maneira geral, os exames necessários para a conduta diagnóstica são:

- Citologia cérvico-vaginal.
- Colposcopia e vulvosscopia.
- Teste de Collins com biópsia dirigida.
- Histopatológico: biópsia dirigida ou excisional na lesão <2 cm

(COELHO e COSTA 2005).

O diagnóstico é firmado por biópsia incisional, que deve incluir o centro da massa tumoral e um pequeno segmento de pele normal, de modo que o patologista possa avaliar adequadamente a profundidade e natureza da invasão estromal. Nos casos de pequenas lesões suspeitas, é preferível a biópsia excisional à incisional, a fim de não perder esse parâmetro ou referência anatômica (HACKER 2009).

Atraso no diagnóstico do câncer vulvar é um problema comum, particularmente se a lesão tem uma aparência verrucosa, proporcionando a rápida evolução da doença. Embora condilomas isolados não necessitem de confirmação histológica para o diagnóstico, qualquer lesão verrucosa confluyente deve ser feita a biópsia adequadamente antes da terapia médica ou ablativa ser iniciada (RICCI et al. 2008; HACKER 2009).

Lembrando que a biópsia para confirmar o diagnóstico e o exame histopatológico das lesões é de extrema importância na programação da conduta terapêutica.

1.2.7 Estadiamento

A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) adotou um sistema de estágio cirúrgico modificado para carcinoma de vulva (Quadro 1).

Quadro 1 - Estadiamento FIGO para carcinoma de vulva

Estadio	Achados clínicos
Estadio 0	Carcinoma in situ; carcinoma intraepitelial
Estadio IA	Tumor confinado à vulva ou períneo; 2 cm ou menos na maior dimensão; com invasão estromal menor ou igual a 1mm e sem metástase linfonodal
Estadio IB	Tumor confinado à vulva ou períneo; 2 cm ou menos na maior dimensão; com invasão estromal maior que 1mm e sem metástase linfonodal
Estadio II	Tumor de qualquer tamanho com disseminação adjacente (1/3 uretra inferior, 1/3 vagina, ânus); sem metástase linfonodal
Estadio IIIA	Tumor de qualquer tamanho com metástase linfonodal da inguino-femoral (i) 1 linfonodo acometido maior ou igual a 5 mm (ii) 1-2 linfonodo(s) acometido(s) em menos de 5mm
Estadio IIIB	(i) 2 ou mais metástases linfonodais maiores ou iguais a 5mm (ii) 3 ou mais metástases linfonodais menores que 5mm
Estadio IIIC	Linfonodos positivos com disseminação extra-capsular
Estadio IVA	(i) Tumor invade outras estruturas regionais (2/3 uretra superior, 2/3 vagina), mucosa da bexiga, mucosa retal ou fixada ao osso pélvico (ii) Linfonodos inguino-femorais fixos ou ulcerados
Estadio IVB	Metástase à distância, incluindo linfonodos pélvicos

Fonte: MOORE et al. (2009) e FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2014).

O sistema TNM prévio baseava-se no tamanho do tumor, sua localização e situação linfonodal.

Na classificação TNM, adota-se como critérios de estadiamento o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal e a metastatização à distância, conforme descrito:

- T – tumor primário.

- TIS – carcinoma pré-invasivo (carcinoma *in situ*).
- T1 – tumor confinado à vulva e/ou períneo com 2 cm ou menos na sua maior dimensão.
- T2 – tumor confinado à vulva e/ou períneo com mais de 2 cm na sua maior dimensão.
- T3 – tumor de qualquer tamanho com invasão da uretra e/ou ânus.
- T4 – tumor de qualquer tamanho infiltrando a mucosa vesical e/ou retal incluindo a porção superior da mucosa uretral e/ou fixação ao osso.
- N – linfonodos regionais.
- N0 – linfonodos não palpáveis.
- N1 – linfonodos regionais unilaterais metastáticos.
- N2 – linfonodos regionais bilaterais metastáticos.
- M – metástase à distância.
- M0 – ausência de metástase.
- M1 – metástase à distância (incluindo linfonodos pélvicos metastáticos) (COELHO e COSTA 2005).

Como o índice de falha na avaliação da palpação dos linfonodos inguinais era muito considerável, o sistema de estadiamento foi alterado para cirúrgico, incorporando o status anátomo-patológico dos linfonodos inguinais (COELHO e COSTA 2005; HACKER 2009). Atualmente é empregada a classificação TNM correlacionada com o sistema FIGO (Quadro 2).

Quadro 2 - Estadiamento TNM para carcinoma de vulva

Estágios	TNM		
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
Estágio IVA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4	Qualquer N	M0
Estágio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: MOORE et al. (2009) e FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2014).

1.2.8 Disseminação

A propagação do câncer vulvar acontece pelas seguintes rotas de disseminação:

1. Extensão direta, para envolver as estruturas adjacentes, tais como a vagina, uretra e ânus.
2. Embolização linfática para os linfonodos regionais.
3. Hematogênica, disseminando para locais distantes, incluindo os pulmões, o fígado e os ossos (HACKER 2009).

Em uma etapa precoce de desenvolvimento, o carcinoma invade o estroma em extensão microscópica; ele é caracterizado como microinvasivo quando sua penetração for de até 1 mm e seu diâmetro de até 2 cm (RICCI et al. 2008).

Na evolução do câncer vulvar, as células neoplásicas multiplicam-se e invadem, sob a forma de blocos, extensões de órgãos adjacentes. Devido à estreita vizinhança que a vulva tem com a vagina, uretra, bexiga, ânus e reto, esses órgãos são atingidos com relativa frequência, à medida que ocorre disseminação tumoral por contiguidade (RICCI et al. 2008).

A embolização de células neoplásicas, que irão dar origem a metástases em linfonodos, quase sempre ocorre de maneira escalonada, passando sucessivamente pelas cadeias inguinais superficiais e profundas, até atingir a cadeia pélvica. Inicialmente, propagação ocorre nos linfonodos inguinais (RICCI et al. 2008; HACKER 2009).

A disseminação hematogênica ocorre tardiamente no desenvolvimento do câncer vulvar e é rara na ausência de metástase linfonodal. É incomum em pacientes com um ou dois nódulos positivos na região inguinal e mais frequente em pacientes com 3 ou mais nódulos positivos. Quando presente, a metastatização via hematogênica é preferencialmente pulmonar (RICCI et al. 2008; HACKER 2009).

1.2.9 Tratamento

As principais orientações no tratamento do câncer de vulva são baseadas nas diretrizes de prática clínica do Comitê de Oncologia Ginecológica da FIGO e da *International Gynecologic Cancer Society* (IGCS), publicados em novembro de 2003 (RICCI et al. 2008).

A terapia escolhida é baseada principalmente na avaliação da extensão da doença, acometimento linfonodal, histórico médico, estado geral da paciente e na recorrência tumoral (MOORE et al. 2009).

Os tipos de cirurgia mais comuns incluem a ressecção ampla da lesão (exérese do tumor), vulvectomy simples (ressecção dos grandes e pequenos lábios, região clitoridiana e da região interna vestibular), vulvectomy radical (ressecção total da vulva, desde a região púbica, sulcos gênero-femorais e posteriormente o períneo, contornando o ânus, com realização da linfadenectomia), vulvectomy supra-radical (vulvectomy radical associada ao esvaziamento linfonodal pélvico bilateral) (COELHO e COSTA 2005).

O tratamento do câncer vulvar inclui opções cirúrgicas, radioterapia e quimioterapia; no entanto, devido à baixa incidência da doença e a falta de estudos randomizados, não há um consenso no melhor tratamento do câncer vulvar. Muitas questões sobre a indicação de diferentes abordagens de tratamento ainda continuam sem resposta (WOELBER et al. 2011; BAIOCCHI e ROCHA 2014). As tendências atuais no manejo desta doença são focadas em uma abordagem mais individualizada (MOORE et al. 2009).

Esse tratamento personalizado requer um conhecimento mais específico sobre a biologia e o desenvolvimento do tumor, bem como de biomarcadores de prognóstico inequívoco, preditivo e farmacodinâmico para determinar a conduta terapêutica (BRENNAN et al. 2010).

1.3 ALTERAÇÕES GENÔMICAS E EPIGENÉTICAS EM CARCINOMAS VULVARES

Alterações no genoma são fatores cruciais para a compreensão das neoplasias e diversas técnicas estão disponíveis para tal objetivo. No carcinoma vulvar a expressão protéica tem sido o foco nos últimos anos, e poucos estudos relevantes sobre o status genômico foram realizados.

Técnicas clássicas de citogenética revelaram rearranjos em 11p, perdas em 3p, 5q, 8p 10q 15q 19p 22q, Xp entre outros, e ganhos em 3q (SWANSON et al. 1997; TEIXEIRA et al. 1999; PINTO 2002). Um destes estudos, conduzido por TEIXEIRA et al. (1999), verificaram clones diplóides e tetraplóides em três tumores moderadamente diferenciados, os quais possuíam uma série de rearranjos cromossômicos (TEIXEIRA et al. 1999).

Técnicas mais apuradas, tais como *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA) foram empregadas em estudos envolvendo o carcinoma vulvar. No primeiro, KUNJOONJU et al. (2005) testaram 122 genes candidatos implicados em perdas e ganhos em linhagens celulares de câncer de vulva (KUNJOONJU et al. 2005). A perda do gene TMSB10 foi à alteração mais frequentemente observada, ocorrendo em 11 das 12 linhagens. A proteína codificada por esse gene é responsável pela regulação da polimerização da actina, controle do crescimento e diferenciação celular. A segunda técnica foi empregada para avaliar as alterações epigenéticas; foi observado que o gene TP73, envolvido na

regulação do ciclo celular, foi o mais frequentemente metilado. Para tanto foram analisados 11 genes em 13 linhagens celulares de pacientes com câncer de vulva (STEPHEN et al. 2009).

Alterações citogenéticas foram identificadas por técnicas de hibridação genômica comparativa (CGH). Essas técnicas identificam os números de cópias genômicas aberrantes por meio de hibridação competitiva do DNA genômico em sondas. O número de cópias então é obtido através do balanço entre as duas amostras (teste e normal) e reflete a intensidade do sinal de cada uma delas (LOCKWOOD et al. 2006).

Tumores humanos são conhecidos por progressivos acúmulos de alterações genéticas e epigenéticas. Gênese e progressão do câncer humano são ativadas pela função aberrante de genes que regulam aspectos da proliferação celular, apoptose, a estabilidade do genoma, angiogênese, invasão e metástase (HUANG et al. 2011). A força motriz no desenvolvimento desses tumores é a aquisição de alterações genômicas somáticas como substituições de bases individuais, translocações, inserções, alterações no número de cópias e mudanças epigenéticas. Alterações adquiridas no número de cópias somáticas, que são diferentes das variações herdadas de números de cópias germinativas (CNV) que existem em todos os indivíduos, são muito comuns no câncer (VAN DER VEKEN e BUIJS 2011). A importância das alterações no número de cópias somáticas (CNA) foi evidente nos casos de oncogenes e genes supressores de tumor. As CNAs resultaram em alteração da expressão desses genes quando comparadas com a sua expressão fisiológica (HUANG et al. 2011).

Em cânceres vulvares são poucos os dados a respeito das variações de cópias genômicas. Em 2001 o primeiro relato envolvendo 10 amostras de carcinomas vulvares utilizando a metodologia de CGH encontrou perdas em 4p13-pter (porção terminal telomérica) e ganhos em 3q como as alterações mais frequentes. Também foram encontradas perdas em 3p, 5q, 6q e 13q e ganhos em 8q (JEE et al. 2001). As alterações observadas em 3p e 3q foram confirmadas por outros trabalhos em carcinomas vulvares que se seguiram (ALLEN et al. 2002; BRYNDORF et al. 2004; RAITANEN et al. 2004; HUANG et al. 2005). Os ganhos de 3q já foram descritos em diversos tumores sólidos como ovarianos, de cabeça e pescoço (KNUUTILA et al. 1999) e pulmonares (DUENSING e MÜNGER 2004) e são vistos como um possível mecanismo de carcinogênese por abrigar diversos candidatos a oncogenes (LAZO et al. 1992; HUANG et al. 2005). Outro achado recorrente nos carcinomas vulvares foi o ganho no braço longo do cromossomo 8 e perda do braço curto do mesmo cromossomo (ALLEN et al. 2002; BRYNDORF et al. 2004; RAITANEN et al. 2004; HUANG et al. 2005).

Poucos trabalhos publicados até o momento envolvendo carcinomas vulvares e variação no número de cópias do DNA relacionam as alterações encontradas com fatores prognósticos, nem tampouco realizaram a investigação ou validação de genes que possam estar envolvidos na carcinogênese vulvar. Esse tipo de estudo pode contribuir para a melhor compreensão do câncer de vulva, uma vez que a variação no número de cópias pode alterar a expressão dos genes incluídos naquele segmento de DNA sujeito à CNA, isso pode favorecer uma hiper ou hipoexpressão desses

genes causada pela incapacidade de regulação transcricional desse número aberrante de cópias (HASTINGS et al. 2009).

A análise das alterações no número de cópias através da técnica de *Comparative Genomic Hybridization array* (aCGH), realizada pelo aluno de doutorado André Mourão Lavorato da Rocha, identificou possíveis drivers para a validação em carcinoma de vulva. Dentre esses genes, ROCK1 e RhoD foram eleitos para a investigação neste estudo.

1.4 MOTILIDADE CELULAR

O comportamento migratório celular é um processo essencial em todos os organismos multicelulares e ele é dirigido por diversos sinais extracelulares que atuam quer como atrativos ou repulsivos. Esses sinais provocam uma variedade de respostas intracelulares que incluem mudanças na organização e contratilidade do citoesqueleto de actina (MURPHY et al. 2001; RAFTOPOULOU e HALL 2004).

A reestruturação do citoesqueleto ocorre em diferentes partes da célula, facilitando as alterações dinâmicas necessárias para a adesão, o crescimento e a motilidade celular (MOORMAN et al. 1999; HALL 2012).

A atividade detalhada da organização e da motilidade celular está sob o controle de proteínas da família Rho GTPases. O programa complexo de migração celular depende da ativação localizada de cada uma dessas proteínas em pequenos domínios do citoplasma, que, por sua vez, capacitam à célula como um todo a se mover em uma direção ou outra. Para

isso, filamentos de actina formam diversos tipos de projeções na superfície das células em direção ao movimento pretendido. Algumas dessas projeções são estruturas dinâmicas, como lamelopódias e filopódias, usadas pela célula para explorar o território e a impulsionar, permitindo assim o avanço celular (ALBERTS et al. 2006; WEINBERG 2008).

A contração do corpo celular é igualmente importante para o movimento direcionado da célula. Essa contração também é coordenada, em grande parte, por membros da família Rho de proteínas. Encorajados a formarem feixes de actina no citoplasma, as proteínas Rho são capazes de criar estruturas conhecidas como “fibras de estresse”, contribuindo para a regulação da contratilidade do citoplasma (WEINBERG 2008).

A ativação das proteínas Rho necessita ser muito bem coordenada no tempo e no espaço para que o programa de mobilidade celular seja executado apropriadamente (WEINBERG 2008).

A locomoção celular necessita de uma polarização inicial da célula para posicioná-la em uma direção particular. Para auxiliar na organização do movimento persistente em uma direção determinada, as células utilizam seus microtúbulos. Os microtúbulos são um dos principais componentes do citoesqueleto, sendo essencial no transporte vesicular, divisão, migração e polarização celular (WATANABE et al. 2005; ALBERTS et al. 2006; LOBERT e STENMARK 2011).

A integridade da actina do citoesqueleto e as redes de microtúbulos são essenciais para o transporte de vesículas e, conseqüentemente, as

proteínas que organizam o citoesqueleto também podem participar do tráfego vesicular (MURPHY et al. 2001).

A característica mais insidiosa no câncer é a sua capacidade de propagação e comprometimento de órgãos à distância via um complexo processo de metástase. Para que a metástase ocorra, é necessária uma reorganização e repolarização celular coordenada pelas proteínas da família Rho GTPases. O papel preciso das Rho GTPase na invasividade do tumor ainda não está totalmente elucidado (WEINBERG 2008; McCLATCHEY 1999).

1.5 RHO GTPases

Proteínas Rho são membros da superfamília Ras de pequenas GTPases (21-25Kda) reguladas pela troca GDP/GTP através do controle positivo de fatores de permuta dos nucleotídeos de guanina que catalisam a substituição de GDP para GTP e controladas negativamente por proteínas GTPase que aceleram a atividade intrínseca, promovendo a inativação da proteína pela ligação a forma GDP (ROBERTS et al. 2008). Ativadas, as Rho GTPases - GTP se ligam preferencialmente a efetores sequenciais, estimulando diversas cascatas de sinalizações citoplasmáticas que controlam importantes redes de processos celulares básicos responsáveis pela regulação do citoesqueleto.

As proteínas Rho regulam alterações morfológicas específicas do citoesqueleto através dos microfilamentos de actina. As Rho GTPases

ativadas são essenciais no rearranjo do citoesqueleto, contração celular, motilidade, diferenciação, polaridade celular, expressão gênica, dinâmica da membrana, progressão do ciclo celular, adesão, apoptose, transporte intracelular, tráfico vesicular (MURPHY et al. 2001; SYMONS e RUSK 2003; JANK et al. 2006; BOUREUX et al. 2007; ROBERTS et al. 2008).

A família Rho GTPases compreende 20 proteínas, que são divididas em oito subgrupos com base em sua sequência de aminoácidos, motivos estruturais, proteínas e funções biológicas: proteínas Rac (Rac1, RAC2, RAC3 e RhoG), proteínas Rho (RhoA, RhoB e RhoC), proteínas CDC42 (CDC42, RhoQ e RhoJ), proteínas Rnd (RND1, Rnd2 / RhoN, e Rnd3 / RhoE), proteínas RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2), RhoH, RhoUV (RhoU e RhoV), e da subfamília RhoF (RhoD e RhoF) (MURALI e RAJALINGAM 2014). Cada uma dessas proteínas têm funções especializadas em reorganizar a forma celular e favorecer sua mobilidade.

O interesse bioquímico e biológico nas Rho GTPases tem focado nos três membros clássicos: RhoA, Rac1 e Cdc42, que estão envolvidos na formação de fibras de estresse, lamelipodia e filopodia, respectivamente (BOUREUX et al. 2007; GAD et al. 2012).

As proteínas Rho estão envolvidas em todas as fases da progressão do câncer, influenciando sua capacidade migratória para invadir e metastatizar. Embora a descoberta inicial das Rho GTPase como reguladores da dinâmica do citoesqueleto tem explicitado sua contribuição na migração e invasão no câncer, sua função não se restringe a estes

eventos, podendo afetar as células tumorais por meio da modulação da transcrição gênica, divisão e sobrevivência celular (VEGA e RIDLEY 2008).

Há controvérsias quanto à real contribuição das proteínas da família RHO na carcinogênese, que as torna um ótimo desafio para o estudo dos mecanismos de desenvolvimento e migração de células neoplásicas malignas, além da aplicação dessas moléculas como futuros biomarcadores ou alvos terapêuticos.

1.6 RHO-ASSOCIATED COILED-COIL CONTAINING PROTEIN KINASE1 (ROCK1)

ROCK1 é uma serina/treonina quinase que funciona como efetores sequenciais de pequenas GTP-ligadas à proteína RhoA. A sinalização Rho via ROCK regula um número de funções celulares incluindo organização do citoesqueleto de actina, adesão celular e migração celular (LOCK et al. 2012). O gene humano ROCK1 está localizado no cromossomo 18 (18q11.1).

A transição de complexo focal para adesão focal é, em parte, uma função de RhoA e seus efetores downstream (ROCK1 e ROCK2), que estimulam a contratilidade da miosina. Ambas isoformas de ROCK desempenham uma função na regulação do citoesqueleto de miosina através da fosforilação e inibição da subunidade da cadeia leve de fosfatase da miosina (LOCK et al. 2012; TANG et al. 2012).

Ao ser ativado, ROCK fosforila alguns substratos, como os canais leves de miosina (MLC), a subunidade MLC fosfatase (MYPT-1) e LIM kinase. Esses substratos catalizam diversos processos durante as mudanças morfológicas, como exemplificadas na Figura 2.

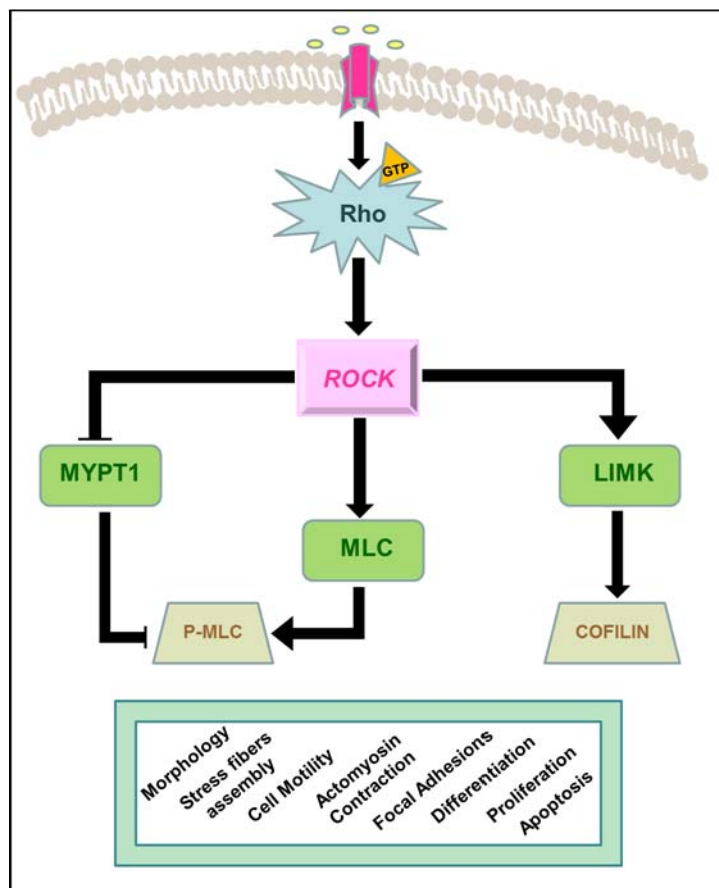


Figura 2 – Respostas celulares acionadas por ROCK. Proteínas Rho ativadas, como RHoA e RhoC, ligam-se ao ROCK, ativando-o que, por sua vez fosforila uma variedade de substratos. Os principais substratos do ROCK incluem cadeia leve da miosina (MLC), miosina subunidade de ligação do MLC fosfatase 1 (MYPT1) e cinases Lim (LIMK). Esses substratos estão envolvidos na regulação da sobrevivência e morte celular.

ROCK1 pode mediar características oncogênicas em vários tumores, como aumento da invasão de células de câncer e direta fosforilação das cadeias leves de miosina, que conduzem ao aumento da migração e invasão celular, ativação da sinalização AKT/mTOR/eIF4E, e aumento da produção de citocina M-CSF que facilitam a metástase. Baseados em sua atividade oncogênica, estudos têm focalizado interesse em ROCK como alvo terapêutico em vários tumores, como glioblastoma, próstata e mama (SOMLYO et al. 2000; LANE et al. 2008; ZOHRABIAN et al. 2009; LIU et al. 2011).

LIU et al. (2011) mostraram que ROCK1 é altamente expresso em várias linhagens de células tumorais e em tecidos de pacientes com osteossarcoma. Utilizando a técnica de silenciamento do gene (siRNA), eles observaram que houve uma diminuição da proliferação, viabilidade e a indução da apoptose em linhagens de sarcoma. Adicionalmente, a alta expressão de ROCK1, determinada por imuno-histoquímica, foi associada com pior prognóstico em pacientes com osteossarcoma. Este estudo apresenta ROCK1 como um promissor alvo terapêutico no tratamento de osteossarcoma (LIU et al. 2011).

O papel preciso de ROCK1 na carcinogênese e no rearranjo estrutural das células tumorais ainda é muito debatido (NAKASHIMA et al. 2011). A função de ROCK1 no câncer pode estar implicada no complexo balanço entre sua função oncogênica e pró-apoptótica, que variará no tipo celular.

1.7 RAS HOMOLOG FAMILY MEMBER D (RHOD)

RhoD foi primeiramente descrito em 1996 como uma molécula de ligação entre o tráfico de membrana e o citoesqueleto. O gene *RhoD* está localizado no cromossomo 11 (11q14.3), podendo ser encontrado na membrana plasmática e no endossomo precoce (MURPHY et al. 1996).

RhoD tem uma atividade de troca de nucleotídeos intrínseca superior aos outros membros da família Rho, resultando em predominância na conformação ativa, ligado ao GTP, mesmo em células em repouso (NEHRU et al. 2013). Quando ativado, RhoD causa rearranjo do citoesqueleto de actina e de células de superfície, e administra a motilidade e distribuição endossomal precoce (MURPHY et al. 1996; MURPHY et al. 2001). De fato, as principais funções de RHOD estão atreladas à sua localização celular.

MURPHY et al. (1996) identificaram e exploraram as propriedades funcionais de RhoD. Em células BHK causa o desaparecimento das fibras de estresse de actina do corpo celular, das protrusões da membrana plasmática e uma concomitante perda de proteínas associadas à adesão focal. Através da técnica de transferrina, eles identificaram sua localização no endossoma precoce e a superexpressão de RhoD bloqueia o movimento dessa organela. Já em 2001, esse mesmo grupo tentou determinar quais os efeitos de RhoD na dinâmica endossomal. Utilizando a construção constitutivamente ativa de rab5 (rab5Q79L), uma importante GTPase que aumenta a fusão endossomal e sua motilidade ao longo dos microtubulos, demonstrou que RhoD neutraliza os efeitos de rab5 no endossoma precoce. Além disso, a forma constitutivamente ativada de RhoD, RhoDG26V,

também altera a dinâmica da membrana, prejudicando a mobilidade das células endoteliais (MURPHY et al. 1996; MURPHY et al. 2001).

TSUBAKIMOTO et al. (1999) inocularam em fibroblastos uma forma constitutivamente ativa de RhoD (RhoDG26V) que causa alterações no citoesqueleto que incluem a desmontagem das fibras de estresse de actina e das adesões focais, porém o dominante negativo RhoDT31K não tem efeito nessas estruturas. Estas alterações implicam que RhoD tem um efeito antagonista a RhoA, pelo menos na desmontagem das fibras de estresse e adesões focais. Além disso, eles constataram que RhoD interfere na citocinese por controlar a formação dos anéis de contractilidade da actina, suprimindo a formação de estruturas do citoesqueleto. A prevenção da citocinese, sem divisão nuclear, parece resultar na formação de células multinucleadas (GAD et al. 2012; NEHRU et al. 2013; TSUBAKIMOTO et al. 1999). Alguns estudos ponderam que RhoD pode ser atribuído na prevenção do potencial invasivo e metastático das células transformadas.

Contudo, existem estudos que alegam que a expressão de RhoD conduz a aberrações na formação celular que são as principais características do fenótipo de instabilidade cromossômica exibida por muitas células cancerosas. RhoD está associado com a proliferação celular e a sua superexpressão pode induzir à progressão do ciclo celular da fase S para a fase G1. O efeito sobre a proliferação está associado com a diminuição da diferenciação e amplificação centrossomal, levando à formação de fusos multipolares aberrantes e segregação anormal (KYRKOU et al. 2013).

OBJETIVOS

**“Todos os nossos sonhos podem se realizar, se tivermos a
coragem de persegui-los.”**

Walt Disney

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar a expressão dos genes candidatos que foram identificados em regiões com ganho de cópias nas amostras de carcinoma vulvar pelo método de CGH-array, a fim de determinar melhores e mais acurados valores prognósticos no carcinoma vulvar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar a expressão dos genes candidatos *ROCK1* e *RhoD* através de qRT-PCR.
- 2- Analisar a expressão de ROCK1 e RhoD em carcinoma epidermóide invasor da vulva através de IHQ.
- 3- Correlacionar todos os achados obtidos a partir da IHQ e qRT-PCR com os principais dados clínico-patológicos e de sobrevida das pacientes.

A metodologia e os resultados desta tese serão apresentados sob a forma de artigos científicos. O primeiro artigo foi publicado na revista BMC Cancer (ISSN: 1471-2407 2014 Nov 7;14:822) e o segundo artigo será submetido à revista Tumor Biology (ISSN: 1010-4283)

ARTIGOS

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO 1: “*ROCK1 as a novel prognostic marker in vulvar cancer*”

Trabalho publicado na revista: **BMC Cancer** Fator de Impacto: 3.32 doi: 10.1186/1471-2407-14-822 ISSN: 1471-2407 2014 Nov 7;14:822

Erica M. Akagi^a, André M. Lavorato-Rocha^a, Beatriz de Melo Maia^a, Iara S. Rodrigues^a, Kátia C. Carvalho^b, Monica M. Stiepcich^c, Glauco Baiocchi^d, Yukie Sato-Kuwabara^e, Silvia R. Rogatto^f, Fernando A. Soares^{a,e}, and Rafael M. Rocha^a

^aMolecular Morphology Laboratory – Investigative Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

^bDepartment of Obstetrics and Gynecology – School of Medicine of São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil

^cPathology Department – Fleury Institute, São Paulo, SP, Brazil

^dDepartment of Gynecology Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

^eDepartment of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

^fNeoGene Laboratory, AC Camargo Cancer Center, São Paulo and Dept of Urology, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

ABSTRACT

Background: Vulvar carcinoma is an infrequent tumour, accounting for fewer than 3% of all malignant tumours that affect women, but its incidence is rising in the past few decades. In young women, the manifestation of the vulvar carcinoma is often linked to risk factors such as smoking and HPV infection, but most cases develop in women aged over 50 years through poorly understood genetic mechanisms. Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1 (ROCK1) has been implicated in many cellular processes, but its function in vulvar cancer has never been examined. In this study, we aimed to determine the prognostic value of ROCK1 gene and protein analysis in vulvar squamous cell carcinoma (VSCC).

Methods: ROCK1 expression levels were measured in 16 vulvar tumour samples and adjacent normal tissue by qRT-PCR. Further, 96 VSCC samples were examined by immunohistochemistry (IHC) to confirm the involvement of ROCK1 in the disease. The molecular and pathological results were correlated with the clinical data of the patients. Sixteen fresh VSCC samples were analyzed by array-based comparative genomic hybridization (aCGH).

Results: In each pair of samples, *ROCK1* levels were higher by qRT-PCR in normal tissue compared with the tumour samples ($p=0.016$). By IHC 100% of invasive front areas of the tumour and 95.8% of central tumour areas were positive for ROCK1. Greater expression of ROCK1 was associated with the absence of lymph node metastasis ($p=0.022$) and a lower depth of invasion ($p=0.002$). In addition, higher ROCK1 levels correlated with greater

recurrence-free survival ($p=0.001$). Loss of ROCK1 was independently linked to worse cancer-specific survival ($p=0.0054$) by multivariate analysis. This finding was validated by IHC, which demonstrated enhanced protein expression in normal versus tumour tissue ($p<0.001$). By aCGH, 42.9% of samples showed a gain in copy number of the ROCK1 gene.

Conclusions: A gain in *ROCK1* copy number effects overexpression of its transcript and protein levels. In an independent sample set of VSCCs, lower expression levels of ROCK1 correlated with worse survival rates and a poor prognosis. These findings provide important information for the clinical management of vulvar cancer.

Keywords: vulvar carcinoma, ROCK1, qRT-PCR, immunohistochemistry, aCGH, prognosis

BACKGROUND

Vulvar carcinoma is an infrequent tumour, accounting for 3% to 5% of all cancers of the female genital system [1,2,3]. Its incidence rises with age, peaking in women aged between 65 and 75 years [4,5].

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) constitutes 90% of all malignant vulvar tumours and has 2 clinicopathological types. The first type arises primarily in younger patients and is associated with human papillomavirus (HPV) infection; the other form is seen mostly in elderly patients and appears to develop independently of HPV infection. These types of VSCC have disparate epidemiological, clinical, pathological, and molecular characteristics [3,4,6]. Despite its rarity, the incidence of VSCC has been rising in the past

several decades, necessitating the identification of predictive factors of its prognosis.

Changes in cellular dynamics induce morphological alterations in cells, due to reorganization of the actin cytoskeleton. The Rho family of small GTPases are central regulators of the dynamics and reorganization of the actin cytoskeleton, mediating the formation of stress fibers and focal adhesions [7,8,9]. Certain members of the Rho family, such as RhoA and RhoC, interact with downstream targets, culminating in various cellular responses. Their principal activity is to promote actomyosin contractility by phosphorylating a specific serine/threonine kinase, Rho-kinase associated coiled-coil (ROCK).

ROCK1 and 2 have been implicated in many cellular processes and pathologies, particularly in metastatic processes of cell lines and in the cardiovascular and nervous systems. Based on their oncogenic activity, ROCKs are being examined as therapeutic targets in various tumours, such as non-small-cell lung tumours [10]; glioblastoma [11]; osteosarcoma [12]; and prostate [13,14], breast [15], ovarian [16], hepatocellular [17], and bladder cancers [18].

Human *ROCK1* maps to chromosome 18 (18q11.1) [19,20,21,22] and performs its functions by phosphorylating substrates, such as myosin light chain (MLC), the MLC phosphatase subunit (MYPT-1), and LIM kinase; many other substrates continue to be reported. These substrates catalyze many processes during morphological changes and metastasis, including structural rearrangement, adhesion, alterations in cellular polarity, migration, invasion, transformation, proliferation, cytokinesis, and apoptosis [9,22,23].

The precise function of *ROCK1* in carcinogenesis and in the architectural rearrangement of tumour cells during metastasis remains debated [24]. *ROCK1* appears to be implicated in a complex balance between oncogene function and proapoptotic responses, depending on the cell type. Based on its involvement in cell migration in other tumours and the lack of data on its function in vulvar carcinomas, we selected *ROCK1* for further study.

We aimed to examine the function of ROCK1 in the progression of vulvar carcinoma. In this study, we measured ROCK1 mRNA and protein levels and analyzed the data on ROCK1 copy number alterations from a parallel project of our group. The transcript and protein results were correlated with clinicopathological characteristics to determine the prognostic value of ROCK1 in vulvar cancer.

METHODS

Patient and sample selection

A total of 96 invasive vulvar carcinoma samples were randomly and retrospectively selected from the archives of the AC Camargo Cancer Center Anatomic Pathology Department from January 1990 to December 2010 and analyzed by immunohistochemistry. All samples were formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE), and their HPV status has been reported [2,5,25]. Sixteen fresh frozen tumour samples and 11 adjacent nontumour samples were also obtained from the AC Camargo Cancer Center Biobank for mRNA expression and DNA copy number analysis.

The inclusion criteria were patients who had undergone surgery or biopsy in this hospital and were diagnosed with invasive vulvar squamous cell carcinoma. All cases were H&E-stained and reviewed by experienced pathologists to confirm the previous diagnosis and adapt the reports to updated nomenclature. The clinical data on all patients were obtained from their medical records. In situ carcinomas, cases in which neoadjuvant radiotherapy and/or chemotherapy were performed, and cases that lacked sufficient material or clinical information for the analyses were excluded from the study.

This work was approved by the ethics committee at AC Camargo (Research Ethics Committee number 1672/12) and was performed per the Helsinki Declaration.

RNA extraction from fresh frozen samples

The RNeasy Mini Kit RNA Extraction Kit (QIAGEN, Austin, TX, USA) and a Precellys® 24 homogenizer (Stretton Scientific, Stretton, UK) were used to extract RNA from the fresh frozen samples per the manufacturer's instructions. Prior to the extraction, the H&E slides from all samples were reviewed by the Biobank's chief pathologist (Dr. AHJFMC). Aliquots of RNA were stored at -80°C until cDNA synthesis.

Quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR)

Gene expression was analyzed by RT-qPCR on an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) using the TaqMan Universal PCR Master Mix detection system (Applied Biosystems), according to the supplier's specifications. Primers and probes for *ROCK1* (Hs01127688_m1) were purchased from Applied Biosystems. *HPRT* was used as an endogenous control. Data analyses were performed, comparing adjacent normal and tumorous vulvar samples. The Pfaffl (2001) method was used to obtain relative quantification (RQ) values and determine gene expression levels [26].

Immunohistochemistry

Four-micrometer-thick FFPE samples were placed on StarFrost® electrically charged slides (Braunschweig, Germany). All reactions were performed on whole-tissue slides using the Advance Kit Protocol (DAKO). Antigen recovery was performed using Tris-EDTA (pH 9.0) in a water bath (96°C). The primary antibody was anti-ROCK1 (ABCAM, Cat.#1761-1, Clone EP786Y), diluted 1:100. At the end of the reaction, the slides were washed with tap water, dehydrated sequentially in alcohol and xylene, and mounted manually.

Evaluation of immunohistochemistry

Slides were digitalized on an APERIO® scanner and scored visually. IHC expression patterns were evaluated quantitatively, wherein expression levels were scored by the percentage of positive cells and the intensity of immunostaining [$HScore = \sum (ix P_i)$ and P_i : percentage of positive pixels, ranging from 0% to 100% and color intensity of the pixel $i = 0, 1, 2, \text{ or } 3$], ranging between 20 and 250 per Rodrigues et al. [25]. Final HScores were

defined as HScore = 1 when the positivity was weak, with staining intensity ranging from 20 to 149 and HScore = 2 for strong staining and a staining intensity of ≥ 150 . ROCK1 immunostaining was present in all samples.

Two areas for each case—the central tumour and invasive front—were examined for ROCK1 expression. As described (Rodrigues et al. 2013), the central tumour was considered as the largest area of extension of the tumour; at least 3 areas were selected and analyzed. The invasive front was defined as a group of up to 5 cells that detached from the main tumour mass, which usually infiltrated the adjacent stroma; 10 fields were selected [25].

Array based-comparative genomic hybridization array (aCGH)

Based on our ROCK1mRNA and protein data, we examined ROCK1 copy number alterations in vulvar carcinoma samples by array-CGH using data from a parallel study. A total of 200 ng each of tumour DNA and normal commercially available DNA (Human Genomic DNA: Female; Promega, Madison, USA) were analyzed compared on an 8x60 K Agilent platform for aCGH (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA).

The labeling, hybridization, and washes were performed per the Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic Labeling kit protocol (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA). The slides were scanned on a DNA microarray scanner with SureScan High-Resolution Technology (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA), based on HG19, and the results were extracted using Feature Extraction, v10.7.3.1 (Agilent

Technologies®, Santa Clara, USA). Copy number analysis was performed using Nexus Copy Number Software, v6.0 (Biodiscovery, El Segundo, USA).

A copy number alteration was defined as exceeding the significance threshold of 1×10^{-6} in a minimum of 5 consecutive probes and in more than 30% of the samples.

Thresholds were defined as the average \log_2 CGH fluorescence ratio for copy gains ≥ 0.3 , high copy number gains defined as ≥ 0.6 , losses defined as ≤ -0.3 , and homozygous losses defined as ≤ -1.0 . Nonrandom genomic copy number alterations were identified using the Fast Adaptive States Segmentation Technique 2 (FASST2) algorithm and the Significance Testing for Aberrant Copy number (STAC) statistical method [27,28]. Alterations that were detected in at least 42.9% of samples were examined in greater detail.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, IBM), version 20.0. Protein expression in the tumour center and invasive front was compared by Wilcoxon signed-rank test. Mann-Whitney test and student t-test were used to analyze the association between protein expression and clinicopathological parameters, and the Kaplan-Meier method was used to examine specific cancer survival and recurrence-free survival rates. The difference between survival curves was assessed by log-rank test. Multivariate analyses were performed using the Cox proportional hazards regression model. Statistical significance was set to $p \leq 0.05$.

RESULTS

Demographic and clinicopathological features

The mean age of the 96 patients was 75 years, ranging from 30 to 103 years. The mean age at menopause was 50 years, ranging between 38 and 60 years. Most patients were Caucasian (83.3%) and did not consume alcohol (88.5%); 15.6% of patients were current or past smokers.

Forty eight percent of the patients were HPV-positive, most of whom had the subtypes HPV16 (48%), HPV33 (24%), and HPV18 (15%). Associated lesions were present, such as vulvar intraepithelial neoplasias (VINs; 13.5% of patients) and lichen sclerosus (6.25%). Based on the histological diagnosis, moderately differentiated squamous cell carcinomas (SCC2) was the most prevalent form (46%), followed by SCC1 (34%), basaloid (9%), SCC3 (8%), sarcomatoid (2%), and verrucous carcinoma (1%). Most tumours were classified as FIGO stage IB (53.1%), followed by stage IIIB (20.3%), IIIA (12.1%), II (6.2%), IIIC (6.2%), and IVA (2.1%). Of the 96 patients with VSCC, 34.4% died due to the cancer, and 46.9% expired due to other causes.

ROCK1 mRNA expression

By RT-qPCR, *ROCK1* was down expressed in tumour tissue samples compared with the normal adjacent ($p = 0.0167$, **Figure 1A**). Also, ROCK1 HScores were higher in normal epithelium versus the tumour areas in a subset of samples ($n=21$) ($p<0.001$) (**Figure 1B, C, and D**).

ROCK1 immunostaining

ROCK1 immunostaining was heterogeneous and cytoplasmic in all tumour extensions (**Figure 2**) and positive in the invasive front of all cases (100%) and in 92 central tumours (95.8%). There was a significant positive correlation between central tumour and invasive front expression of ROCK1 ($p < 0.001$; **Figure 3A**).

In the statistical analysis, greater expression of ROCK1 in central tumours and the invasive front correlated significantly with the absence of lymph node metastasis ($p = 0.036$ and $p = 0.022$, respectively), the presence of inflammatory infiltrate ($p = 0.010$ and $p = 0.009$, respectively), and a lower depth of invasion ($p = 0.048$ and $p = 0.002$), as shown in **Figure 3B**. There was no association between ROCK1 positivity and HPV infection, histological type, FIGO stage, recurrence, or vascular invasion.

ROCK1 expression and patient survival

Patients with lower expression of ROCK1 in the central tumour and invasive front had lower recurrence-free survival rates ($p = 0.004$ and $p = 0.001$, respectively; **Figure 4A** and **B**), and those with weak ROCK1 expression in the invasive front experienced lower cancer-specific survival ($p < 0.001$; **Figure 4C** and **D**). By multivariate analysis, high ROCK1 expression in the invasive front was independently associated with greater cancer-specific survival (HR 0.3, 95% CI 0.11–0.84, $p = 0.0054$; **Table 1**). The clinicopathological characteristics were analyzed by Cox regression. Lymph node metastasis (data not shown) and vascular invasion were independently

associated with decreased of the survival ($p = 0.0074$ and 0.0365 , respectively).

aCGH analysis

By aCGH analysis 29 regions underwent significant copy number alterations: 9 were associated with copy number loss (8p23.3, 5q11.1-q11.2, 3p11.1-q11.1, 9p23 21p11.2-p11.1, Xq28, 7q36.3 19p13.3, and 21p11.2), and 20 had gains (1q22 20q11.21-q11.23 1p36.23-p36.22 11q13.3 19q13.12 19q13.32, 7q11.21, 7q11.22, 7q11.23, 7q11.23, 7q22.1 11q12.2-q12.3 11q12.3 11q13.2 16q22.1 18q11.1-q11.2 18q11.2, 7p22.2-p22.1 12q24.31, and 15q11.1-q11.2). Of the latter, region 18q11.1-q11.2, which harbors *ROCK1*, had more copies than the reference DNA in 42.9% of samples (Figure 5).

To identify their function and the processes that they mediate, the genes that were selected in the copy number analysis were included in an *in silico* functional analysis, performed by Ingenuity Pathways Analysis (IPA). *ROCK1* appeared in 2 of the top 5 canonical pathways with the highest ratios—RhoGDI and Rho GTP signaling—both of which are associated with cell migration.

DISCUSSION

ROCK has significant functions in cancer progression and metastasis, rendering it a potential therapeutic target [9]. In this study, we examined the function of the Rho-associated protein kinase *ROCK1* in human vulvar

carcinoma. Our data showed that aspects that are related to a good prognosis, such as the absence of lymph node metastasis, lower depth of invasion, and better survival, correlated with ROCK1 immunoexpression, suggesting that ROCK1 is a marker of good prognosis in vulvar cancer.

ROCK1 immunopositivity was observed in the tumour invasion fronts of all cases and in nearly all central tumour areas. Also, there was no difference in ROCK1 expression levels between central tumour versus invasive front areas, in contrast to what we have reported concerning the variability of epithelial to mesenchymal transition markers [26], EGFR [29], and c-Kit [5] in tumours. Nevertheless, vulvar carcinomas can be highly heterogeneous [29,30], and cytoplasmic immunostaining for ROCK1 protein was heterogeneous in all tumour extensions in our cases, reflecting a disadvantage of ROCK-targeting therapies in this tumour type.

In this study, we performed a global evaluation of ROCK1 expression and its relationship with clinical data and the prognosis. ROCK has a significant influence on cancer progression [8,9,11,31], metastasis [17,21,32,33], and apoptosis [12,23,34]. Recent evidence suggests that ROCK phosphorylates PTEN [34,35], a negative regulator of the PI3-K/Akt pathway, with roles in cell survival and apoptosis [34,36].

Inhibition of ROCK/Rho-kinase in Ras-transformed cells is insufficient to effect a motile phenotype in them, suggesting that this cell type requires changes in other regulators of the cytoskeleton to increase its motility [32]. Notably, elongated cells, such as SW-962, a vulvar squamous cell carcinoma

metastatic cell line do not require Rho or ROCK function, unlike cells that move through rounded, or amoeboid, movement [21,37,38].

Thus, we hypothesize that elongated vulvar carcinoma cells move and migrate using mechanisms other than Rho/ROCK activation. The effectiveness of therapeutic agents against ROCK, such as fasadil and Y27632, might be limited when cells move through elongated morphology [37].

ROCK1 immunostaining was also associated with important clinical features in vulvar cancer and with the most significant clinical property and prognostic factor in this tumour: lymph node metastasis. When overexpressed, ROCK1 correlated inversely with lymph node metastasis in the central tumour and invasive front. To define groups for the statistical analysis regarding the clinical implications of the presence or absence of lymph node involvement, we considered positivity as metastasis when 2 or more lymph nodes were involved and negativity when 1 or 0 lymph nodes were involved. This strategy was based on a previous study that demonstrated that 5-year survival for patients with negative or 1 positive lymph node did not differ from each other [39]. Similarly, greater expression in the central tumour and invasive front was associated with lower invasive depth and higher recurrence-free survival.

Clinicopathological characteristics analyzed by Cox regression demonstrated that lymph node metastasis and vascular invasion were independently associated with decreased of the survival, indicating that these features are related to poor survival in patients with VSCC. Also, higher expression of

ROCK1 was linked to greater survival, the absence of lymph node metastasis, and a lower depth of invasion. Moreover, elevated ROCK1 levels in the invasive front was an independent protective factor (HR = 0.22 for moderate expression, and HR = 0.33 for strong expression) with regard to cancer-specific survival ($p = 0.0054$).

These results implicate ROCK1 as a good prognostic marker in vulvar cancer. In addition, patients with weak expression of ROCK1 in the invasive front, but not the central tumour, had lower cancer-specific survival rates, implying that this marker is protective during cancer progression. Conversely, ROCK1 has been largely reported as a marker of worse prognosis in many cancer types [12].

There is emerging evidence that ROCK governs the morphological events that take place during apoptosis (cell contraction, membrane blebbing, nuclear fragmentation, and disintegration of apoptotic cells) through cytoskeletal rearrangement and actomyosin contractility [40,41]. Other groups contend that ROCK1 is required for apoptotic fragmentation and phagocytosis of dying COS-7 cells [41]. Because ROCK is a proapoptotic regulator in various cell types, depending on the cell type and apoptotic stimulus [40], we believe that its overexpression in vulvar cancer is associated with apoptotic stimuli and, thus, it can be associated with better prognosis; as demonstrated in other studies [41,42]. Although the relationship between apoptosis and the prognosis remains unknown, it could, at least in part, explain the association of ROCK1 with a good prognosis in vulvar cancer.

ROCK1 copy number gains were detected in 42.9% of our samples. However, these data are controversial, because ROCK1 was more highly expressed in normal tissue by IHC and RT-qPCR compared with tumour samples. Although associations between copy number and gene expression comprise the concomitant amplification of the gene with enhancement of its expression, there remain other genes, approximately 50% [43], the amplification of which does not correspond to gene overexpression.

We hypothesize that tissues that were used for normalization of the validation techniques were adjacent to the tumour. Despite careful morphological analysis by an experienced pathologist of nontumour tissue, the proximity of malignant cells could have influenced the surrounding microenvironment, upregulating various genes, including ROCK1, in normal epithelia.

In addition, other mechanisms, such as microRNA regulation and epigenetic alterations (including methylation and histone deacetylation), might cause the lack of correlation between the genomic and proteomic data found in our study. Previous reports have demonstrated the function of microRNAs (eg, microRNA-135a and microRNA124-3p) in *ROCK1* regulation in prostate, gastric, and bladder carcinoma [44,45,46].

Also, despite the increase in copy number in tumour samples by aCGH analysis, we can not make any conclusions regarding gene integrity and the extent of its abnormal. Our results do not allow us to conclude much concerning the amplification of ROCK1 in the tumour samples or on the possible generation of aberrant mRNA or truncated protein. The genomic mechanism that leads to gene amplification in tumour cells remains

undefined, as do the molecular pathways that effect amplified gene expression.

CONCLUSIONS

This is the first report to demonstrate that ROCK1 correlates with a good prognosis in cancer. Although vulvar carcinomas are rare, this type of cancer can serve as a valuable model in the study of molecular alterations that can be transposed to other types of epithelial neoplasms. Further, novel biomarkers, such as ROCK1, are significant, because its evaluation by IHC in routine practice can help better establish prognosis and select more conservative surgical approaches for this mutilating disease.

Abbreviations

ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1

VSCC (or SCC): vulvar squamous cell carcinoma

HPV: human papillomavirus

IHC: immunohistochemistry

qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction

aCGH: array-based comparative genomic hybridization

MLC: myosin light chain

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten

Acknowledgments:

We thank the AC Camargo Cancer Center Anatomic Pathology Department and Biobank for providing human specimens. This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the National Council of Research (CNPq).

Authors' contributions

Conceived and designed the research studies: RMR, EMA. Performed the experiments: EMA, AMLR, YSK, KCC. Analyzed and interpreted the data: EMA, AMLR, BMM, RMR. Contributed with reagents/materials/analysis tools: ISR, KCC, MMS, GB, YSK, SRR, FAS. Drafted the manuscript: EMA, BMM, AMLR, SRR, RMR. Pathological revision: MMS. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests: All authors declare that they have no competing interests.

References

[1] de Melo Maia B, Munhoz Cestari F, Lavorato-Rocha AM, Sant'Ana Rodrigues I, Baiocchi G, Cardoso Guimarães G, Vassallo J, Stiepcich M, Soares FA, Malagoli Rocha R: **Characterization of sociodemographic and clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma.** *Gynecol Obstet Invest* 2013, 75(1):53-60.

- [2] Lavorato-Rocha AM¹, de Melo Maia B, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Baiocchi G, da Silva Cestari FM, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM: **Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein.** Ann Surg Oncol 2013 20(1):31-9.
- [3] Trietsch MD, Peters AA, Gaarenstroom KN, van Koningsbrugge SH, ter Haar NT, Osse EM, Halbesma N, Fleuren GJ: **Spindle cell morphology is related to poor prognosis in vulvar squamous cell carcinoma.** Br J Cancer 2013 109(8):2259-65.
- [4] del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J: **Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma.** Histopathology 2013, 62(1):161-75.
- [5] de Melo Maia B, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, Baiocchi G, Cestari FM, Stiepcich MM, Chinen LT, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM: **Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside.** J Transl Med 2012 10:150.
- [6] Allen DG, Hutchins AM, Hammet F, White DJ, Scurry JP, Tabrizi SN, Garland SM, Armes JE: **Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridisation in vulvar cancers.** Br J Cancer 2002, 86(6):924-8.
- [7] Morgan-Fisher M¹, Wewer UM, Yoneda A: **Regulation of ROCK activity in cancer.** J Histochem Cytochem 2013, 61(3):185-98.
- [8] Banyard J, Anand-Apte B, Symons M, Zetter BR: **Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases.** Oncogene 2000 19(4):580-91.

- [9] Majid S, Dar AA, Saini S, Shahryari V, Arora S, Zaman MS, Chang I, Yamamura S, Chiyomaru T, Fukuhara S, Tanaka Y, Deng G, Tabatabai ZL, Dahiya R: **MicroRNA-1280 inhibits invasion and metastasis by targeting ROCK1 in bladder cancer.** PLoS One 2012, 7(10):e46743.
- [10] Vigil D, Kim TY, Plachco A, Garton AJ, Castaldo L, Pachter JA, Dong H, Chen X, Tokar B, Campbell SL, Der CJ: **ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion.** Cancer Res 2012, 72(20):5338-47.
- [11] Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M: **Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation.** Anticancer Res 2009 29(1):119-23.
- [12] Liu X, Choy E, Hornicek FJ, Yang S, Yang C, Harmon D, Mankin H, Duan Z: **ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma.** J Orthop Res 2011 29(8):1259-66.
- [13] Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP: **Rho-Kinase inhibitor retards migration and *in vivo* dissemination of human prostate cancer cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications 2000 269(3):652-659.
- [14] Zhang C, Zhang S, Zhang Z, He J, Xu Y, Liu S: **ROCK has a crucial role in regulating prostate tumor growth through interaction with c-Myc.** Oncogene 2013 1-10.
- [15] Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG: **The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer.** Int J Oncol 2008, 33(3):585-93.

- [16] Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K, Kurachi H: **Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cells.** *Cancer Biol Ther* 2012, 13(1):25-33.
- [17] Wong CC, Wong CM, Ko FC, Chan LK, Ching YP, Yam JW, Ng IO: **Deleted in liver cancer 1 (DLC1) negatively regulates Rho/ROCK/MLC pathway in hepatocellular carcinoma.** *PLoS One* 2008, 3(7):e2779.
- [18] Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H: **Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, 9(7):2632-41.
- [19] Guan R, Xu X, Chen M, Hu H, Ge H, Wen S, Zhou S, Pi R: **Advances in the studies of roles of Rho/Rho-kinase in diseases and the development of its inhibitors.** *Eur J Med Chem* 2013, 70:613-22.
- [20] Lock FE, Ryan KR, Poulter NS, Parsons M, Hotchin NA: **Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2.** *PLoS One* 2012, 7(2):e31423.
- [21] Rath N, Olson MF: **Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy.** *EMBO Rep* 2012, 13(10):900-8.
- [22] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K: **Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity.** *Cytoskeleton* (Hoboken) 2010, 67(9):545-54.
- [23] Gurkar AU, Chu K, Raj L, Bouley R, Lee SH, Kim YB, Dunn SE, Mandinova A, Lee SW: **Identification of ROCK1 kinase as a critical**

regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. Nat Commun 2013, 4:2189.

[24] Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Hanamatsu T, Yoshioka T, Okano Y, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H: **Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells.** Molecular Cancer 2011 10:79.

[25] Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, de M Maia B, Stiepcich MM, de Carvalho FM, Baiocchi G, Soares FA, Rocha RM: **Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV.** Br J Cancer 2013 109(1):184-94.

[26] Pfaffl M W: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic Acids Res 2001 29(9): e45.

[27] Diskin SJ, Eck T, Greshock J, Mosse YP, Naylor T, Stoeckert CJ, Weber BL, Maris JM, Grant GR: **STAC: A method for testing the significance of DNA copy number aberrations across multiple array-CGH experiments.** Genome Res 2006 16: 1149-1158.

[28] Silveira SM, Villacis RAR, Marchi FA, Barros Filho MC, Drigo AS, Scapulatempo Neto C, Lopes A, Cunha IW, Rogatto SR: **Genomic signatures predict poor outcome in undifferentiated pleomorphic sarcomas and leiomyosarcomas.** PLOS ONE 2013, 8(6): e67643.

[29] de Melo Maia B, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Brot L, Baiocchi G, Stiepcich MM, Soares FA, Rocha RM: **EGFR expression in**

vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. Human Pathol. 2014, 45(5): 917-25.

[30] Brustmann H: **Epidermal growth factor receptor is involved in the development of an invasive phenotype in vulvar squamous lesions, but is not related to MIB-1 immunoreactivity.** Int J Gynecol Pathol 2007 26(4):481-9.

[31] Mali RS, Ramdas B, Ma P, Shi J, Munugalavadla V, Sims E, Wei L, Vemula S, Nabinger SC, Goodwin CB, Chan RJ, Traina F, Visconte V, Tiu RV, Lewis TA, Stern AM, Wen Q, Crispino JD, Boswell HS, Kapur R: **Rho kinase regulates the survival and transformation of cells bearing oncogenic forms of KIT, FLT3, and BCR-ABL.** Cancer Cell 2011 20(3):357-69.

[32] Sahai E, Olson MF, Marshall CJ: **Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility.** EMBO J 2001 20(4):755-66.

[33] Hosono Y, Yamaguchi T, Mizutani E, Yanagisawa K, Arima C, Tomida S, Shimada Y, Hiraoka M, Kato S, Yokoi K, Suzuki M, Takahashi T: **MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis.** EMBO J 2012, 31(2):481-93.

[34] Li G, Liu L, Shan C, Cheng Q, Budhraja A, Zhou T, Cui H, Gao N: **RhoA/ROCK/PTEN signaling is involved in AT-101-mediated apoptosis in human leukemia cells in vitro and in vivo.** Cell Death Dis 2014, 5:e998.

[35] Li GB, Chenq Q, Liu L, Zhou T, Shan CY, Hu XY, Zhou J, Liu EH, Li P, Gao N: **Mitochondrial translocation of cofilin is required for allyl**

isothiocyanate-mediated cell death via ROCK1/PTEN/PI3K signaling pathway. Cell Commun Signal. 2013 11:50.

[36] Keniry M, Parsons R. **The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy.** Oncogene 2008; 27: 5477–5485.

[37] Sahai E, Marshall CJ: **Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis.** Nat Cell Biol 2003, 5(8):711-9.

[38] Nakayama M, Amano M, Katsumi A, Kaneko T, Kawabata S, Takefuji M, Kaibuchi K: **Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration.** Genes Cells 2005 10(2):107-17.

[39] Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Leuchter RS, Moore JG: **Management of Regional Lymph Nodes and Their Prognostic Influence in Vulvar Cancer.** Obstetrics & Gynecology 1983, 61(4):408-12.

[40] Shi J, Wei L: **Rho kinase in the regulation of cell death and survival.** Arch Immunol Ther Exp 2007, 55(2):61-75.

[41] Orlando KA, Stone NL, Pittman RN: **Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells.** Experimental Cell Research 2006, 312(1): 5-15.

[42] Tanaka F, Kawano Y, Li M, Takata T, Miyahara R, Yanagihara K, Ohtake Y, Fukuse T, Wada H: **Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer.** J Clin Oncol 1999 17(9):2728-36.

[43] Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousset S: **Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer.** *Cancer Res* 2002, 62(21):6240-5.

[44] Kroiss A, Vincent S, Decaussin-Petrucci M, Meugnier E, Viallet J, Ruffion A, Chalmel F, Samarut J, Alloli N: **Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through downregulating ROCK1 and ROCK2.** *Oncogene* 2014, (ahead of print).

[45] Shin JY, Kim YI, Cho SJ, Lee MK, Kook MC, Lee JH, Lee SS, Ashktorab H, Smooy DT, Ryu KW, Kim YW, Chhoi IJ: **MicroRNA 135a suppresses lymph node metastasis through down-regulation of ROCK1 in early gastric cancer.** *PloS One* 2014, 9(1):e85205.

[46] Xu X, Li S, Lin Y, Chen H, Hu Z, Mao Y, Xu X, Wu J, Zhu Y, Zheng X, Luo J, Xie L: **MicroRNA 124-3p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer cells by targeting ROCK1.** *J Trans Med* 2013 11:276.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. ROCK 1 mRNA and protein are overexpressed in normal tissues. ROCK1 is overexpressed by qRT-PCR analysis in normal adjacent samples compared with tumour samples ($p = 0.016$, **A**). Increased ROCK1 immunostaining HScore in normal epithelium compared with tumour in a subset of samples ($n=21$) (**B**); $p < 0.001$. Representative images of normal epithelium (**C**) and tumour (**D**) immunostaining from the same case, captured at 400X magnification.

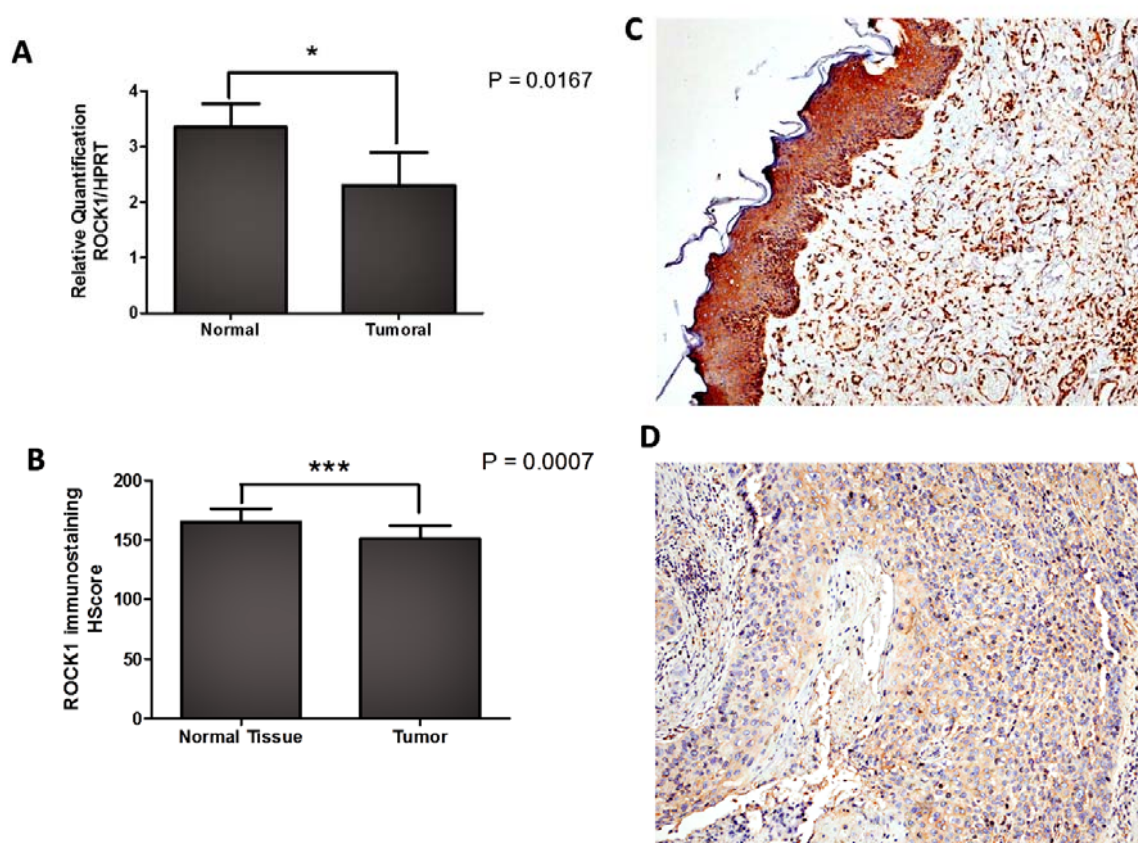


Figure 2. Immunohistochemical staining of ROCK1 in vulva carcinoma.

Representative image of weak-positive staining in central tumour (**A**) and invasive front (**B**, arrows); moderate staining in the central tumour (**C**) and invasive front (**D**, arrows); strong-positive staining in central magnification. Images **A** and **B** were captured at 200X magnification. Images **C**, **D**, **E**, and **F** were captured at 400X magnification.

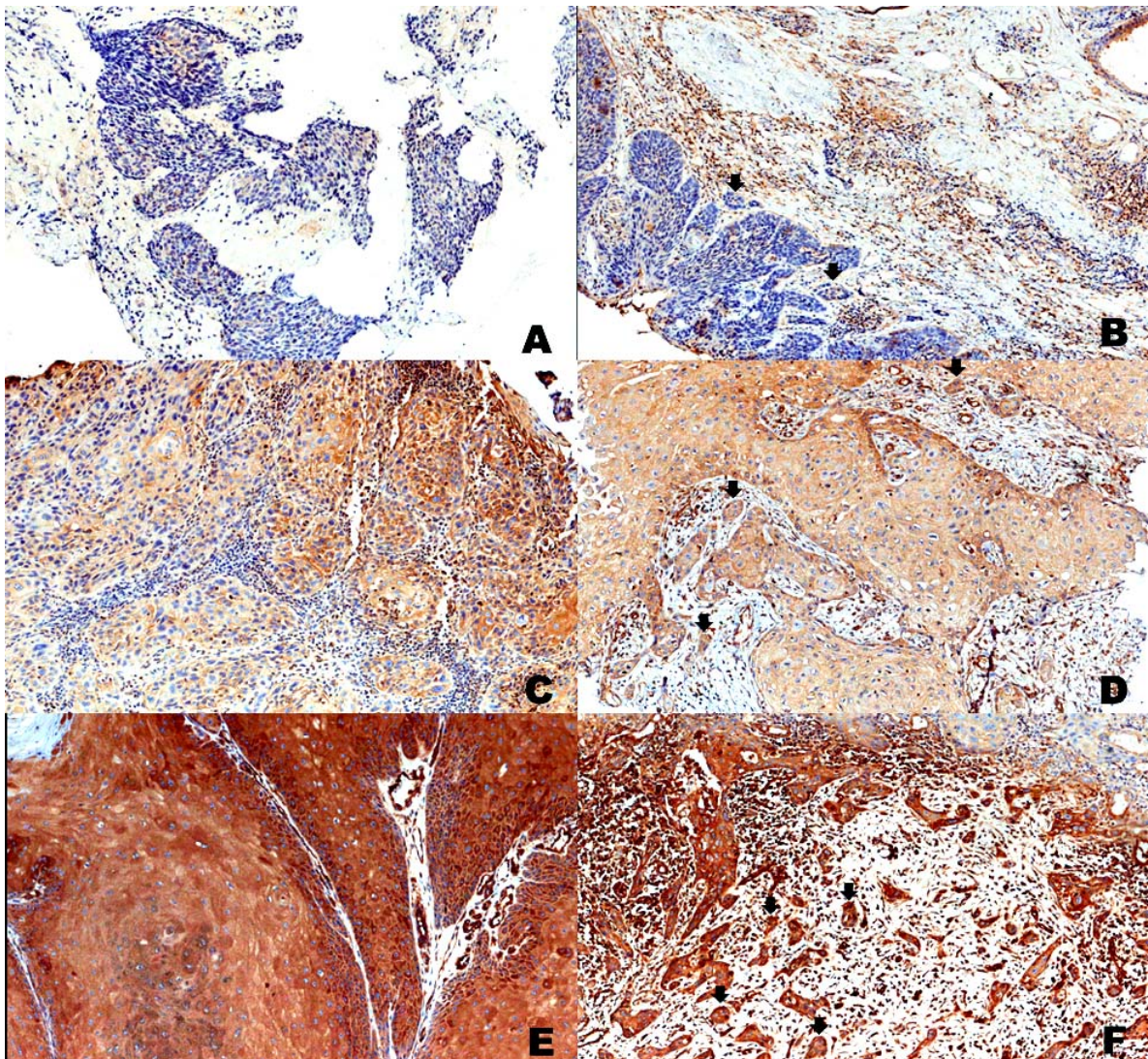


Figure 3. Association between clinicopathological features and ROCK1 in vulvar carcinoma. Abbreviations: ≤ 2 = 2 or fewer lymph nodes involved; > 2 = more than 2 lymph nodes involved; SMD = superficial and mid-dermis; DDA = deep dermis and subcutaneous tissues. *Statistically significant, $p < 0.05$.

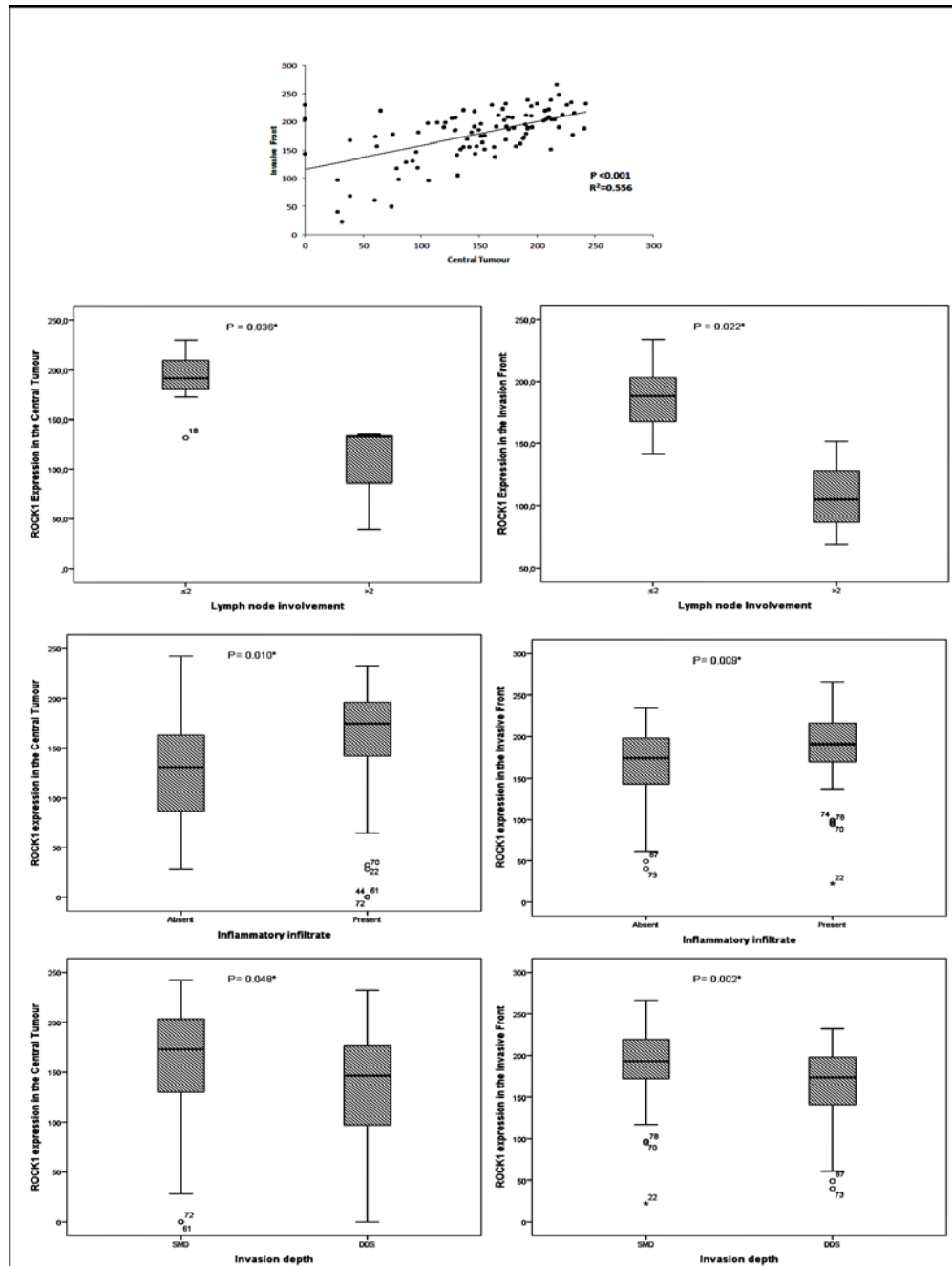


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves for ROCK1 staining. Increased expression of ROCK1 in the central tumour ($p = 0.004$; **A**) and in the invasive front ($p = 0.001$; **B**) correlates with better recurrence-free survival and lower cancer-specific survival in the central tumour ($p = 0.081$; **C**) and in the invasive front ($p < 0.001$; **D**). Abbreviations: CT= central tumour; IF= invasive front.

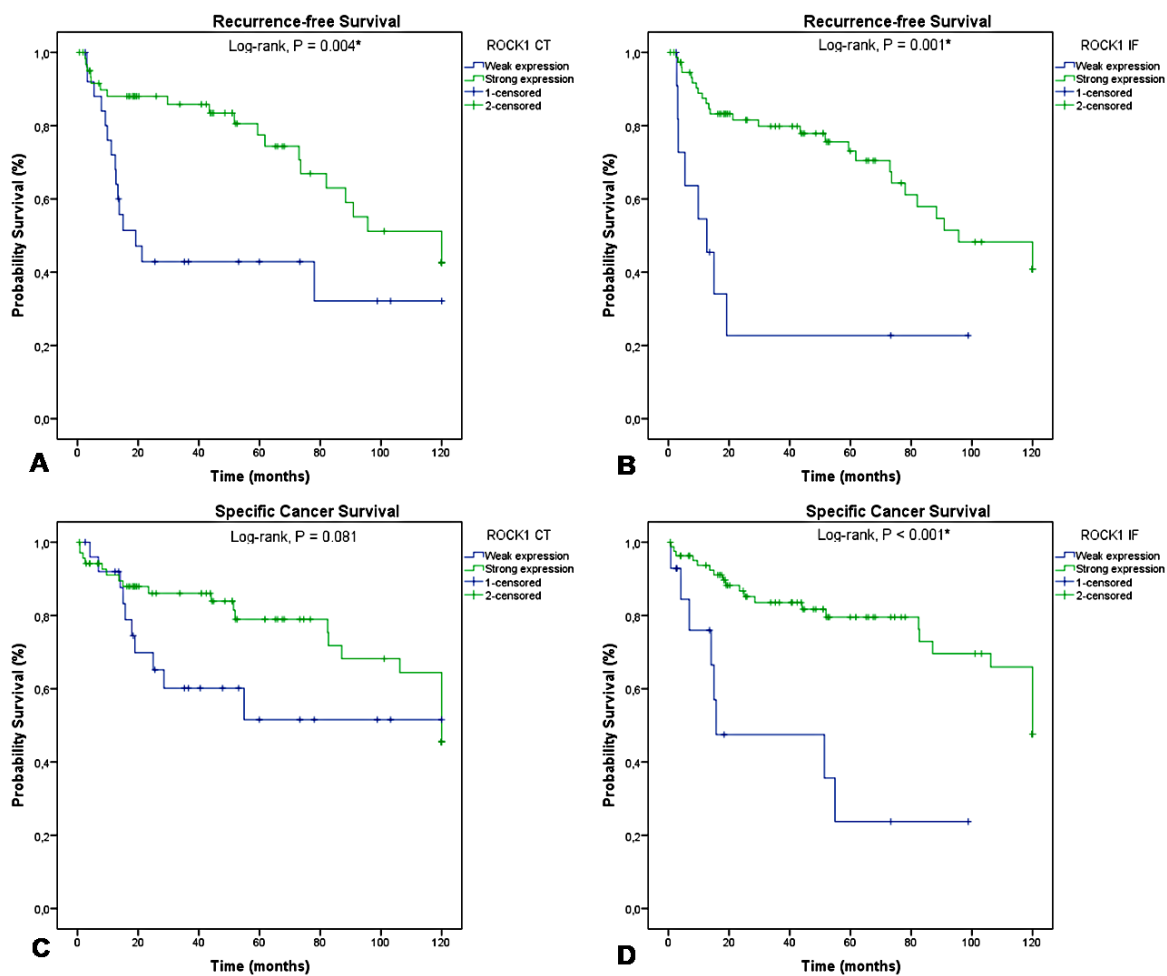
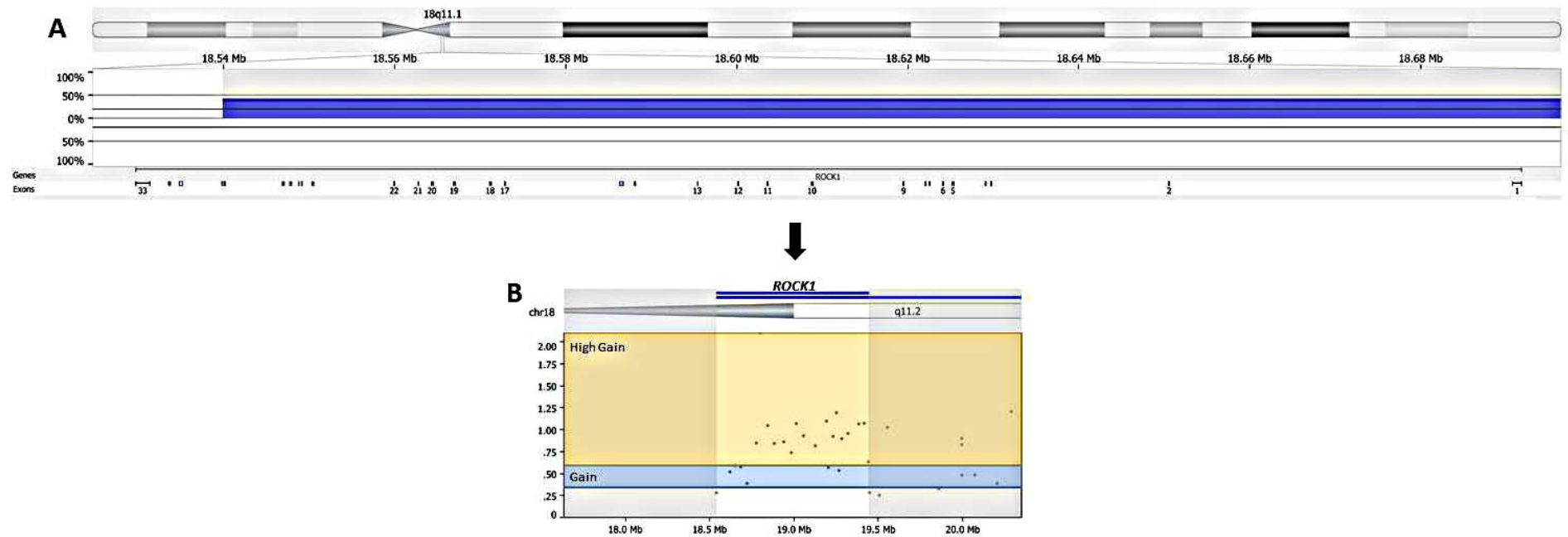


Table 1. Multivariate analysis of ROCK1 expression and clinicopathological characteristics in patients with vulvar SCC.

Variables	Category	n	Hazard Ratio for		
			Survival	95.0% CI	p
Histologic types	SCC1, SCC2, Verrucous Ca (1)	76	1	1	0.6177
	SCC3, Basaloid Ca, Sarcomatoid Ca(2)	20	0.78	0.30 - 2.05	
FIGO stage	IA, IB, II (1)	54	1	1	0.2083
	IIA, IIIB, IIIC, IVA, IVB (2)	40	1.62	0.76 - 3.47	
HPV	Absent (0)	50	1	1	0.2238
	Present (1)	46	0.63	0.30 - 1.33	
Inflammatory infiltrate	Absent (0)	38	1	1	0.4964
	Present (1)	58	0.77	0.36 - 1.64	
Vascular Invasion	Absent (0)	74	1	1	0.0365
	Present (1)	17	2.22	1.03 - 4.77	
Perineural invasion	Absent (0)	76	1	1	0.4178
	Present (1)	12	1.43	0.60 - 3.38	
ROCK1 CT	Weak expression	22	1	1	0.6653
	Moderate expression	55	0.70	0.28 - 1.75	
	Strong expression	19	0.95	0.34 - 2.67	
ROCK1 IF	Weak expression	8	1	1	0.0054*
	Moderate expression	53	0.22	0.08 - 0.60	
	Strong expression	35	0.30	0.11 - 0.84	

Abbreviations: SCC = squamous cell carcinomas; CI = confidence interval; FIGO = International Federation of Gynecology and Obstetrics; HPV = human papillomavirus; SMD = superficial and mid dermis; DDA = deep dermis and subcutaneous tissues; CT = central tumour and IF = invasive front. *Statistically significant, $p < 0.05$.

Figure 5. Representative image of aCGH analysis of chromosome 18 with emphasis on *ROCK1* (A) The copy number gain (chr18:18,539,853-19,429,001) is in blue; exons of *ROCK1* are illustrated at the bottom of the diagram (B) Example highlighting the gains (≥ 0.3) in blue and high gains (≥ 0.6) in yellow. Gene regions covered by each probe can be seen as small dots.



3.2 ARTIGO 2

Trabalho será submetido à revista: Tumor Biology Fator de Impacto: 2.840

ISSN: 1010-4283

***“Small Rho GTPase, RhoD, related as a good prognostic marker in
vulvar cancer”***

Erica M. Akagi¹, Beatriz de Melo Maia¹, André M. Lavorato-Rocha¹, Iara S. Rodrigues¹, Monica M. Stiepcich², Glauco Baiocchi³, Fernando A. Soares⁴, and Rafael M. Rocha¹

¹ Molecular Morphology Laboratory – Investigative Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

² Pathology Department – Fleury Institute, São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Gynecology Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

*** Corresponding author:**

Rafael Malagoli Rocha. Molecular Morphology Laboratory, AC Camargo Cancer Center, Rua Antônio Prudente 109. 1o Andar, Investigative Pathology, Liberdade, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil

Email: rafael.malagoli@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: RhoD is a small Rho GTPase that causes the rearrangement of the actin cytoskeleton and cell surface by collapsed of actin stress fibers and focal adhesions. Furthermore, RhoD is essential in the early endosome and their dynamic motility, providing a link between the cytoskeleton and the membrane traffic. The last years, few authors studied genomic and proteomic alterations in vulvar carcinoma, and none of them have established a prognostic factor in this sense. Our study focused in the translational relationship between RhoD expression and clinicopathological features in patients diagnosed with Vulvar Squamous Cell Carcinoma (VSCC). Methods: RhoD was evaluated in 17 samples by qRT-PCR. Immunohistochemistry (IHC) expression of RhoD was analyzed in 150 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cases of vulvar carcinoma arrayed in a tissue microarray (TMA). Protein extracts of vulvar tumor cell lines (SW954 and SW962) were subjected to Western blot technique to determine the expression of RhoD antibody. Statistical tests were performed correlating the obtained results with the main clinical data of patients. Results: RhoD mRNA expression in tumor samples was greater than in adjacent non-tumor samples by qRT-PCR. IHC analysis showed that greatest expression of RhoD was associated

with the absence of perineural, vascular and lymphatic invasions ($p = 0.014$, $p = 0.001$ and $p = 0.041$, respectively) and with lowest depth of invasion ($p = 0.001$). Increased RhoD expression was associated with better overall and recurrence-free survival ($p = 0.013$ and $p = 0.036$, respectively). In Western blot analysis, no significant difference in the expression of RhoD between the tested cell lines and the control line. Conclusions: We found that RhoD is more expressed in tumor tissues than in adjacent normal tissues, but the overexpression of this protein is linked to better prognosis in VSCC.

Keywords: vulvar carcinoma, RhoD, prognosis

BACKGROUND

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common cancer of the vulva, corresponding to approximately 90% of the vulvar tumors ^[8,16,18]. Although the incidence rates of vulvar cancer in older women presents relatively stable in the last decades, the diagnosis in younger women (40-60 years old) has alarmingly increased ^[18]. Still, despite the increase incidence of the disease, molecular studies in vulvar SCC are little explored in the literature.

RhoD protein was first described in 1996 as a binding molecule from the trafficking of membrane and cytoskeleton ^[11]. *RhoD* gene is located on chromosome 11 (11q14.3) and can be found in the plasma membrane and early endosome. RhoD has an intrinsic activity nucleotide exchange superior to other members of the Rho family, predominantly resulting in the active conformation bound to GTP, even in resting cells ^[13]. When enabled, RhoD

cause rearrangement of the actin cytoskeleton and cell surface, and manages the endosomal motility and distribution^[11,12].

Briefly, RhoD interacts with ZIP kinase, modulating actin assembly and dynamics of focal adhesion^[13]. Changes in the cytoskeleton by RhoD, including disorientation and decrease in the density of actin bundles, loss of stress fibers and focal adhesions, than can lead to a delay of cell migration. Some studies suggest that RhoD can be used to prevent the invasive and metastatic potential of transformed cells^[7,13,17].

Rho GTPases studies have focused on the classic three members of this family: RhoA, Rac1 and Cdc42, which are involved in the formation of stress fibers and filopodia, lamellipodia respectively ^[2,7]. Role of RhoGTPases antagonists has also been described, as RhoD that can antagonize the RhoA function ^[7,17].

However, some studies claim that RhoD expression leads to aberrations in cell formation that they are the main features of the chromosomal instability phenotype displayed by many cancer cells ^[9]. RhoD is associated with cell proliferation and the overexpression of this protein can lead to cell cycle progression from G1 phase to S phase. The effect on proliferation is associated with a decrease in differentiation and centrosomal amplification, leading to aberrant multipolar spindle formation and abnormal segregation^[9,10].

Our study focused in the translational relationship between RhoD expression and clinic-pathological features in patients diagnosed with Vulvar Squamous Cell Carcinoma (VSCC). For this, we have designed this study based on the

mRNA and protein expression of RhoD in VSCC and correlated these findings with clinical and anatomopathological data, in order to evaluate its prognostic value as a cancer biomarker.

METHODS

Patients and pathological specimens

Seventeen fresh frozen samples of Vulvar Squamous Cell Carcinomas (VSCC) were retrospectively selected from the AC Camargo Cancer Center Biobank of between January 1980 and December 2011. Inclusion criteria were diagnosis of invasive VSCC, and exclusion criteria was presence of *in situ* carcinoma vulvar intraepithelial neoplasia, patients who underwent neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy and cases presenting no sufficient material for analysis or those with lack of clinical information on the medical records.

One hundred and fifty formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of tumor tissue were selected from the files of the Department of Pathology, AC Camargo Cancer Center and the cases were used for immunohistochemistry. Representative tumor areas of the VSCC samples from different histological subtypes have been arranged on a tissue microarray (TMA). Diagnostic confirmation was performed by an experienced pathologist using slides stained with H&E. Demographic, clinical and anatomopathological data of patients were collected from medical records of the patients.

This work was approved by the ethics committee at AC Camargo (Research Ethics Committee number 1672/12) and was performed per the Helsinki Declaration.

RNA extraction

For RNA extraction, RNeasy Mini Kit and the Precellys® equipment were used, following all the technical specifications. Extracted samples were aliquoted and stored in a freezer at -80 ° C. The samples were evaluated by the Biobank pathologist prior to extraction, so that only the tumor region was extracted.

Real-time PCR (qRT-PCR)

The qRT-PCR reactions were performed in a total of 17 tissue samples, one being a "pool" of tumor from normal samples and 16 samples extracted edges of tumors. The qRT-PCR reactions were carried out in Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For the relative quantification (RQ) method, TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) detection system was used and the assay for RhoD gene (Hs00989683_m1) was inventoried by Applied Biosystems. As controls for the reactions, endogenous HPRT (hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransferase) and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenasehuman) were used.

Vulvar Squamous Cells Carcinoma Culture Lines

SW954 cells (squamous cell carcinoma of the vulva, HTB-117) and SW962 (lymph node cells from metastatic carcinoma of the vulva, HTB-118) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). The cells were grown in 75 cm² flasks in RPMI culture medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum inactive (Invitrogen) and antibiotics garamycin (Invitrogen, 0.1 mg / ml). The bottles were kept in a humidified incubator at 37° C and 5% CO₂. When subconfluent, the cells were trypsinized (trypsin - 0.25% EDTA) for 5 minutes, centrifuged for 10 minutes at 2000 rpm at 4° C and replated in 25 cm² bottles.

Western Blot Analysis

The SW954 and SW962 cells were trypsinized and centrifuged. The cell pellet was resuspended in RIPA lysis buffer (50mMTrisHCl 150mM NaCl 1% NP-40, 0.5% Sodium Deoxycholate, the 1% SDS, phosphatase inhibitor and protease inhibitor). After centrifugation, the supernatant was collected and assayed protein concentration by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay). For Western blot analysis 25 µg of protein extract was diluted with 4X Laemmli buffer, heated for 5 minutes and subjected to SDS-PAGE 10%. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting in a Tris-Glycine buffer. The membrane was washed with 5% Tween 20 in PBS and blocked in 5% skimmed milk powder (Molico®) for 2 hours. After blocking, incubated with the primary antibody Anti-RhoD (1mg / mL) for 2 hours and then with the secondary antibody conjugated to HRP

Anti-rabbit IgG (Cell Signaling) for 1 hour. Subsequently, the membrane was detected using Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare) developing solution and the protein band was visualized by chemiluminescence using the UVITEC gel documentation systems & software (Cleaver Scientific). MCF-7 (breast adenocarcinoma, HTB-22) cell line was employed as a positive control and anti α -tubulin antibody (ABCAM) was used as reaction control. The Western blot assay was performed in triplicate and expression was observed in all three lines RhoD.

Immunohistochemistry (IHC)

Tumor fragments of 1.0 mm were arranged in duplicate in TMAs and four TMA block-micrometer sections were placed on slides with electric charge (StarFrost). Immunohistochemistry reactions were performed manually using the Novolink kit protocol (Leica). Antigen retrieval and incubations were carried out in a water bath (96° C) in citrate solution (pH 6.0). The RhoD protein was assessed using polyclonal rabbit anti-RhoD (1/750 dilution, LSBio [LS-B6828]). Prior to reactions in TMA slides, the antibody was standardized in tonsil tissue, for positive control, and whole slides of vulvar tumors to determine the homogeneity of the marker in the tissue. At the end of the reaction, the slides were washed in water, dehydrated in alcohol, xylene, and manually mounted.

IHC evaluation

Upon completion of the IHC, all slides were scanned in Panoramic 250 Flash II (3DHitech) equipment and analyzed visually. The pattern of expression was assessed quantitatively by Panoramic Viewer software (3DHitech) DensitoQuant using the analysis module. This software provides a HScore ranging from 0-300. There was no HScore in RhoD expression less than 170 (MED = 222.41, ranging between 174.46 and 271.99). Final HScores were defined as HScore = 1 for weak staining, with staining intensity ranging from $170 \leq$ and <222 ; and HScore = 2 for strong staining, with staining intensity ranging from ≤ 222 and <272 . RhoD immunostaining was present in all samples from the TMA.

To perform statistical analysis, histological diagnosis in vulvar carcinoma samples were categorized in groups 1: SCC1 and SCC2 (better prognosis); and group 2: SCC3, basaloid carcinoma, sarcomatoid carcinoma (worse prognosis). Regarding FIGO staging, the following categorization was adopted: Group 1 – FIGO stages IA and IB; Group 2 - II, IIIA, IIIB and IIIC. To layer the presence or absence of HPV, lymph node metastasis, tumor recurrence, perineural invasion and vascular and lymphatic invasion, the classification 0 for no (absence) and 1 for yes (presence) was adopted. Tumor size was categorized as 1, in smaller tumors than 5 centimeters; and 2 for tumors with tumor greater than 5 centimeters. According to the depth of tumor invasion, group 1 was given to more superficial invasion tumors, including dermis and superficial dermis; and 2 for tumors with deeper invasion (deep dermis and subcutaneous).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, IBM), version 20.0. For the association between protein expression and clinicopathological parameters it was used Anova and Mann-Whitney tests, following confirmation of the non-normal distribution of the samples by test Kolmogorv-Smirnov. For the analysis of overall survival, specific cancer survival and recurrence-free survival, Kaplan-Meier technique was used. The difference between survivals curves were assessed by the log rank test. The significance level was 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTS

Demographic, anatomopathological and clinical data of the patients

The average age of the 150 patients included in this study was 70 years, ranging between 30 and 91 years. The data from medical records showed that average age of menopause of patients was 50 years, ranging between 31 and 64 years. Most women were white (87.8%), married (51%), 96.8% did not consume alcohol and 84.6% did not smoke. In relation to HPV infection, 40.4% of the tested patients were positive for HPV, and HPV16 was the most prevalent type (38%). Regarding FIGO stage, most of the samples were grouped at stages IB (57.3%) and IIIB (20.3%). According to the histological diagnosis, squamous cell carcinoma Grade 2 (SCC2) was the most prevalent (39.5%), as detailed in Table 1.

RhoD mRNA expression

RhoD expression quantitated by relative RT-PCR revealed higher levels of mRNA in tumor samples when compared to normal adjacent samples (figure 1A). IHC evaluation in whole tissue sections revealed a higher HScore in tumor samples compared to normal epithelia (figure 1B and C), corroborating mRNA data. However, there was no correlation between *RhoD* mRNA and clinicopathological data.

Western blot

SW954, SW962 and MCF7 were used to analyze the specificity of anti-*RhoD* antibody. The western blot analysis showed a positive band with molecular weight of approximately 23kDa (figure 2), consistent with the estimated molecular weight. This results indicates that the antibody used in our study is specific to *RhoD* protein.

RhoD expression

The antibody showed cytoplasmic immunostaining for *RhoD* and none of the cases showed negativity of this marker. *RhoD* immunostaining was observed in whole slide tissues demonstrated homogeneity, making suitable the use of TMA slides in this case.

To distinguish the differences of *RhoD* expression between samples, we have adopted HScore classification (as demonstrated previously) and different expressions can be seen in figure 3.

Statistical analysis considering RhoD positivity and clinicopathological data demonstrated a significant association between increased RhoD expression and absence of perineural, vascular and lymphatic invasions ($p= 0.014$ and $p= 0.041$, respectively). Higher expression of RhoD protein was correlated with the lowest depth of invasion ($p = 0.001$), as shown in figure 4.

However, the expression of RhoD was not statistically correlated with the histological diagnosis, FIGO stage, HPV infection, tumor recurrence, or lymph node metastasis.

Survival

Increased expression of RhoD showed better overall survival ($p = 0.013$; figure 5A) and recurrence-free survival ($p = 0.036$; figure 4B). However, there was no statistical relationship with the cancer-specific survival ($p = 0.158$; figure 5C).

DISCUSSION

This study focused on the determination of the prognostic value of RhoD in vulvar cancer, with the aim of translating the RhoD expression levels with clinic and pathological data of patients diagnosed with VSCC. The results of this study demonstrated that RhoD expression seems to be linked to good prognosis in cancer of the vulva, since its greatest expression was related to the absence of vascular, lymphatic and perineural invasion, with less depth of invasion and better survival rates.

Several studies have focused on important molecules in the modification and movement of tumor cells, to understand the function of these molecules in the progression and spread of cancer. The Rho GTPase family is closely connected to these processes, since members of this family are very important in the cellular cytoskeletal rearrangement promoting the modification of the cellular structure. Possibly, tumor cells attempt to subvert these structures, by increasing or decreasing the expression of these molecules, in order to restructure the cell, which may interfere with the metastatic process^[2,15].

The main RhoD functions described are associated with a location in the early endocytic compartment and the plasma membrane, being an important mediator of such dynamic membranes, both regulating intracellular endosomal motility and cell movement^[11].

RhoD induces changes in the actin cytoskeleton, including the loss of focal adhesions and stress fibers disassembly, which may trigger the suppression of cell motility and migration of the endosome. Tsubakimoto et al.^[17], inoculated in fibroblasts a constitutively active form of the RhoD (RhoDG26V), resulting in disassembly of focal adhesions and the stress actin fibers, leading to retardation of cell migration and reversal of the enhancement of the fibers, antagonizing the effect of RhoA.

Overexpression of RhoD was related to cases with absence of perineural, lymphatic and vascular invasion, as well as the lowest depth of invasion. We suggest that in vulvar cancer, RhoD has also the capability to inhibit cell migration. Further studies remain necessary to prove this.

The expression of mRNA RhoD was two times higher in tumor tissues than in adjacent normal tissues. This can be explained by the fact that RhoD induces multinucleation, the defective cytokinesis proliferation and cell cycle progression, factors that are essential for tumor cell growth. Kirkou A. et al. (2013), showed that GTPase-deficient mutant of RhoD, RhoDG26V, *in vivo* had increased cell proliferation and disturbed epidermis differentiation, G1 / S-phase progression of the cell cycle and overduplication of centrosomes *in vitro*^[9].

In other words, RhoD is important in tumor proliferation, but its overexpression has been correlated with the absence of invasion and increased survival.

Studies on vulvar cancer have been directed to novel biomarkers discovered for this tumor type, such as mesenchymal epithelial transition markers^[14], EGFR^[18], SOX2^[3], Survivin^[4], cyclin D1^[5], c-Kit^[6]. This is because even though its relative low incidence, vulvar tumors still presents high recurrence rates^[14] and comorbidity due to poor quality of life of patients diagnosed^[1]. For this reason, we are constantly making efforts to direct our research in the search for new biomarkers that allow early diagnosis of this disease and possible molecules that can interfere with tumor development.

In conclusion, this is the first report describing the association between RhoD expression with the clinicopathological characteristics of patients with vulvar carcinomas. We found that this gene is more expressed in tumors tissues than in adjacent normal tissues, but the overexpression of this protein is linked to better prognosis in VSCC.

Future studies are needed to better understand the mechanisms of interaction between members of the Rho family and the progression of vulvar tumors, particularly RhoD. We believe RhoD to be an important mediator in cytoskeletal rearrangement, intervening metastasis mechanisms in vulvar carcinomas.

Abbreviations

VSCC (or SCC): vulvar squamous cell carcinoma

HPV: human papillomavirus

IHC: immunohistochemistry

RT-PCR: real-time polymerase chain reaction

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded

TMA: Tissue Microarray

Acknowledgments:

We thank the AC Camargo Cancer Center for providing this study. The Anatomic Pathology Department and Biobank of the AC Camargo Cancer Center for grant human specimens. This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the National Council of Research (CNPq).

Competing interests:

No conflicts of interest reported.

References

1. Baiocchi G, Rocha RM. **Vulvar cancer surgery**. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014; 26:9-17.
2. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P: **Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes**. *Mol. Biol. Evol.*; 24(1):203–216 2007.
3. Brustmann H, Brunner A: **Immunohistochemical expression of SOX2 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma**. *Int J Gynecol Pathol*; 32(3):323-328 2013.
4. Brustmann H, Hinterholzer S, Brunner A. **Immunohistochemical expression of surviving and γ -H2AX in vulvar intraepithelial neoplasia and low-stage squamous cell carcinoma**. *Int J Gynecol Pathol*; 30(6): 583-590 2011.
5. Choschzick M, Hess S, Tennstedt P, Holst F, Bohlken H, Giesecking F, Mahner S, Woelber L, Simon R, Sauter G. **Role of cyclin D1 amplification and expression in vulvar carcinomas**. *Hum Pathol*; 43(9): 1386-1393 2012.
6. De Melo MB, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, Baiocchi G, Cestari FM, Stiepcich MM, Chinen LT, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM: **Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside**. *J Transl Med* 2012 10:150.
7. Gad AKB, Ronnlund D, Spaar A, Savchenko AA, Petramyi G, Blom H, Szekely L, Widengren J, Aspenström P: **Rho GTPases link cellular**

- contractile force to the density and distribution of nanoscale adhesions.** FASEB Journal; 26(6):2374-2382 2012.
8. Gadducci A, Tana R, Barsotti C, Guerrieri ME, Genazzani AR. **Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva.** Oncology Hematology; 83: 71-83 2012.
 9. Kyrkou A, Soufi M, Bahtz R, Ferguson C, Bai M, Parton RG, Hoffmann I, Zerial M, Fotsis T, Murphy C: **The RhoD to centrosomal duplication.** Small GTPases; 4(2): 1-7 2013.
 10. Kyrkou A, Soufi M, Bahtz R, Ferguson C, Bai M, Parton RG, Hoffmann I, Zerial M, Fotsis T, Murphy C: **RhoD participates in the regulation of cell-cycle progression and centrosome duplication.** Oncogene; 32: 1831-1842 2013.
 11. Murphy C, Saffrich R, Grummt M, Gournier H, Rybin V, Rubino M, Auvinen P, Lütcke A, Parton RG, Zerial M: **Endosome dynamics regulated by a Rho protein.** Nature; 384(6608): 427-432 1996.
 12. Murphy C, Saffrich R, Olivo-Marin JC, Giner A, Ansorge W, Fotsis T, Zerial M: **Dual function of rhoD in vesicular movement and cell motility.** European Journal of Cell Biology; 80: 391-398 2001.
 13. Nehru V, Almeida FN, Aspenström P: **Interaction of RhoD and ZIP kinase actin filament assembly and focal adhesion dynamics.** Biochemical and Biophysical Research Communications; 433: 163-169 2013.

14. Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, De M, Maia B, Stiepcich MM, De Carvalho FM, Baiocchi G, Soares FA, Rocha RM: **Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV.** Br J Cancer 2013 109(1):184–194.
15. Sahai E, Olson MF, Marshall CJ: **Cross-talk between Ras and Rho signaling pathways in transformation favours proliferation and increased motility.** EMBO J 2001 20(4):755–766.
16. Trietsch MD, Peters AA, Gaarenstroom KN, van Koningsbrugge SH, terHaar NT, Osse EM, Halbesma N, Fleuren GJ: **Spindle cell morphology is related to poor prognosis in vulvar squamous cell carcinoma.** Br J Cancer; 109(8):2259-65 2013.
17. Tsubakimoto K, Matsumoto K, Abe H, Ishii J, Amano M, Kaibuchi K, Endo T: **Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis.** Oncogene; 18: 2431-2440 1999.
18. Woelber L, Hess S, Bohlken H, Tennstedt P, Eulenbug C, Simon R, Giesecking F, Jaenicke F, Mahner S, Choschzick M. **EGFR gene copy number increase in vulvar carcinomas is linked with poor clinical outcome.** J. Clin. Pathol. 2012; 65: 133–139.

Table 1. Clinicopathological data and HPV infection status from Vulvar Squamous Cell Carcinoma patients. Abbreviations: HPV = human papillomavirus; SCC = Squamous Cell Carcinoma; CA = Carcinoma; VIN = vulvar intraepithelial neoplasia; FIGO = International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Category	Variables	%	Type HPV	
HPV infection	Presence	40.4%	HPV 16	37.9%
			HPV 18	13.8%
	Absence	59.6%	HPV 33	10.3%
Histologic type	SCC1	32.9%		
	SCC2	39.5%		
	SCC3	10.5%		
	Basaloid CA	13.2%		
	Sarcomatoid CA	2.6%		
	Verrucous CA	1.3%		
Associated lesions	LS	19.7%		
	VIN	10.6%		
	Condyloma	2.8%		
FIGO stage	I B	57.3%		
	II	5.6%		
	III A	8.4%		
	III B	20.3%		
	III C	7%		
	IV A e B	0.7%		

Figure 1. RhoD mRNA and protein expression in Normal versus Tumor Samples. Higher levels of RhoD mRNA in tumor samples when compared to normal adjacent samples (A). Representative images of normal epithelium (B) and tumour (C) immunostaining from the same case, captured at 400X magnification.

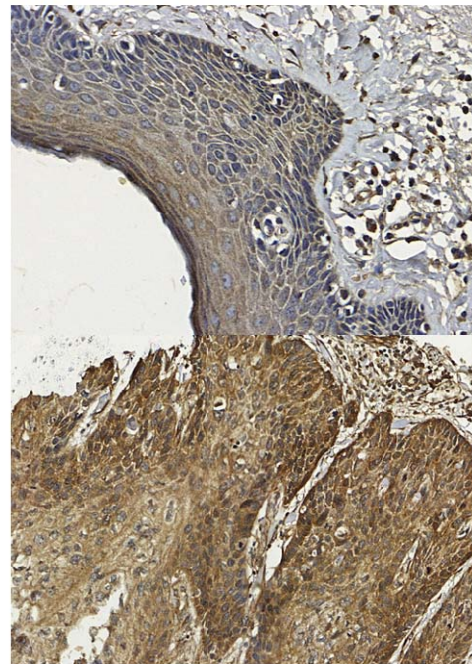
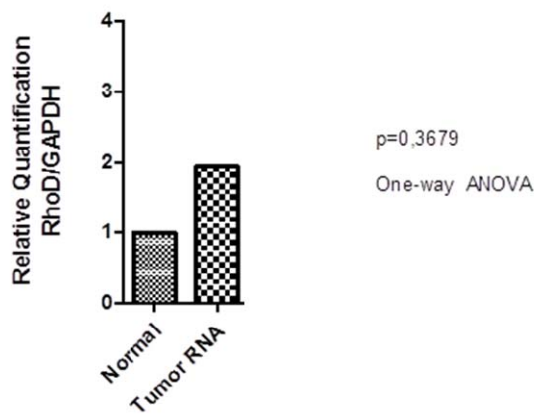


Figure 2. Specificity of the anti-RhoD antibody by Western blot. RhoD expression was analyzed in tumor cell lines of human vulva (SW954 and SW962) and of breast (MCF-7, as positive control). Anti α -tubulin antibody was used as reaction control

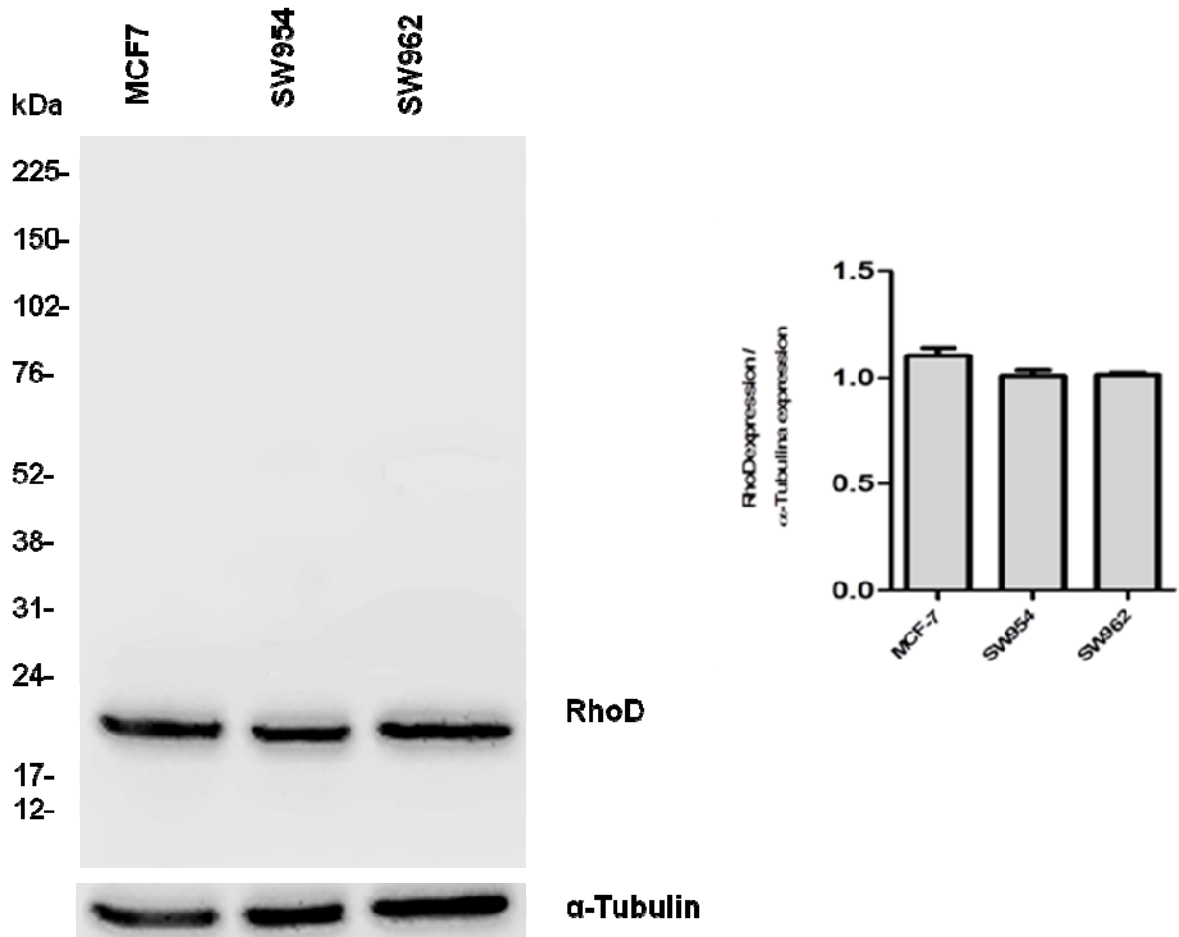


Figure 3. Immunohistochemical staining of RhoD in vulva carcinoma. Representative image of weak-positive staining (A); strong-positive staining (B). Images A and B were captured at 100X magnification.

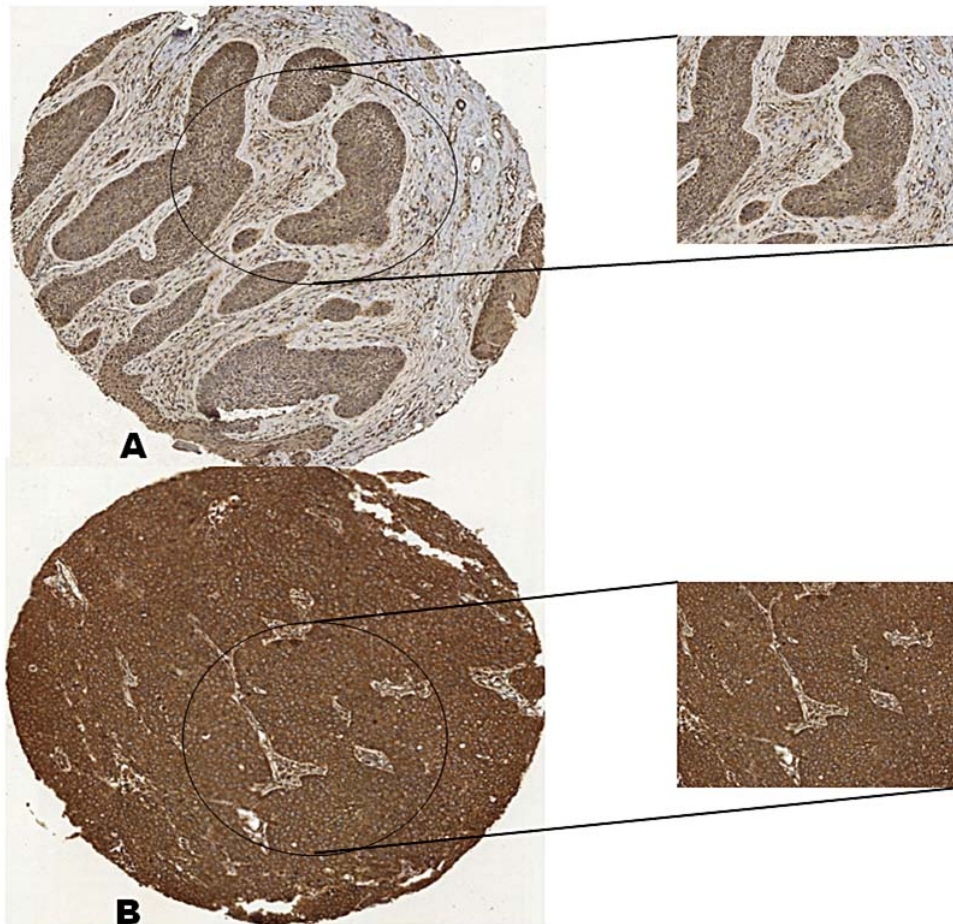


Figure 4. RhoD immunostaining in vulvar carcinomas. Abbreviations: SMD = superficial and mid-dermis; DDA = deep dermis and subcutaneous tissues. *Statistically significant, $p < 0.05$.

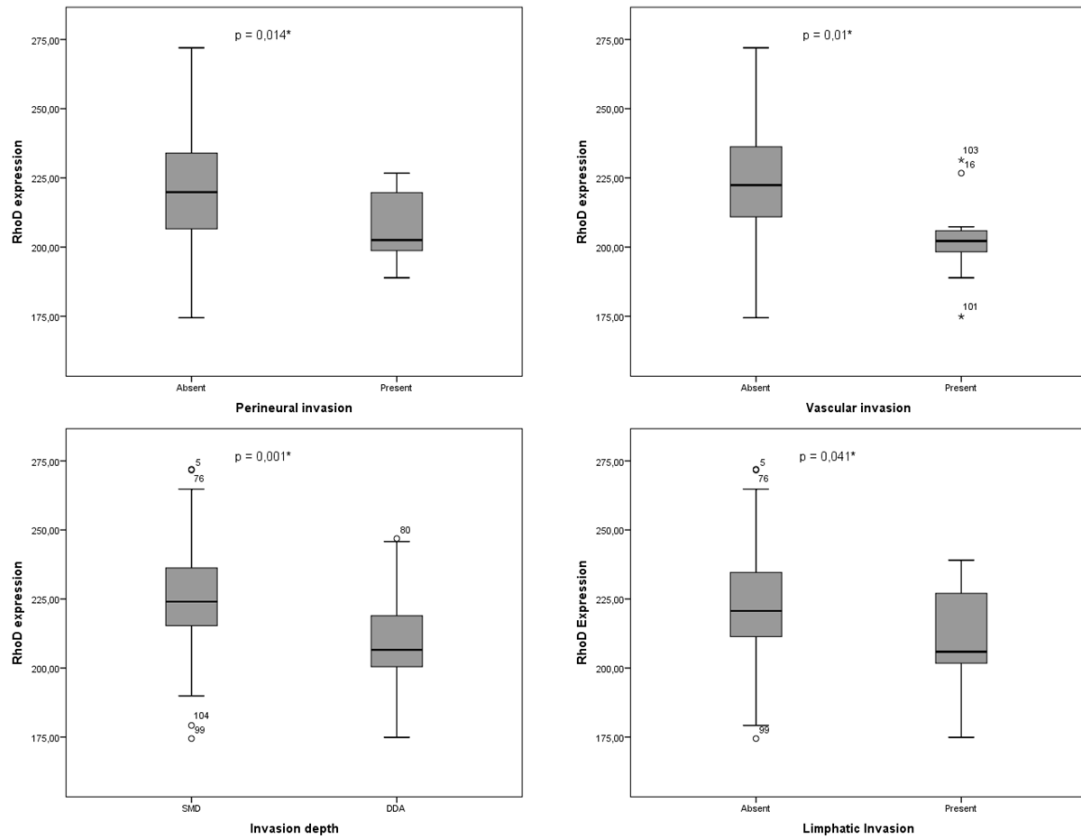
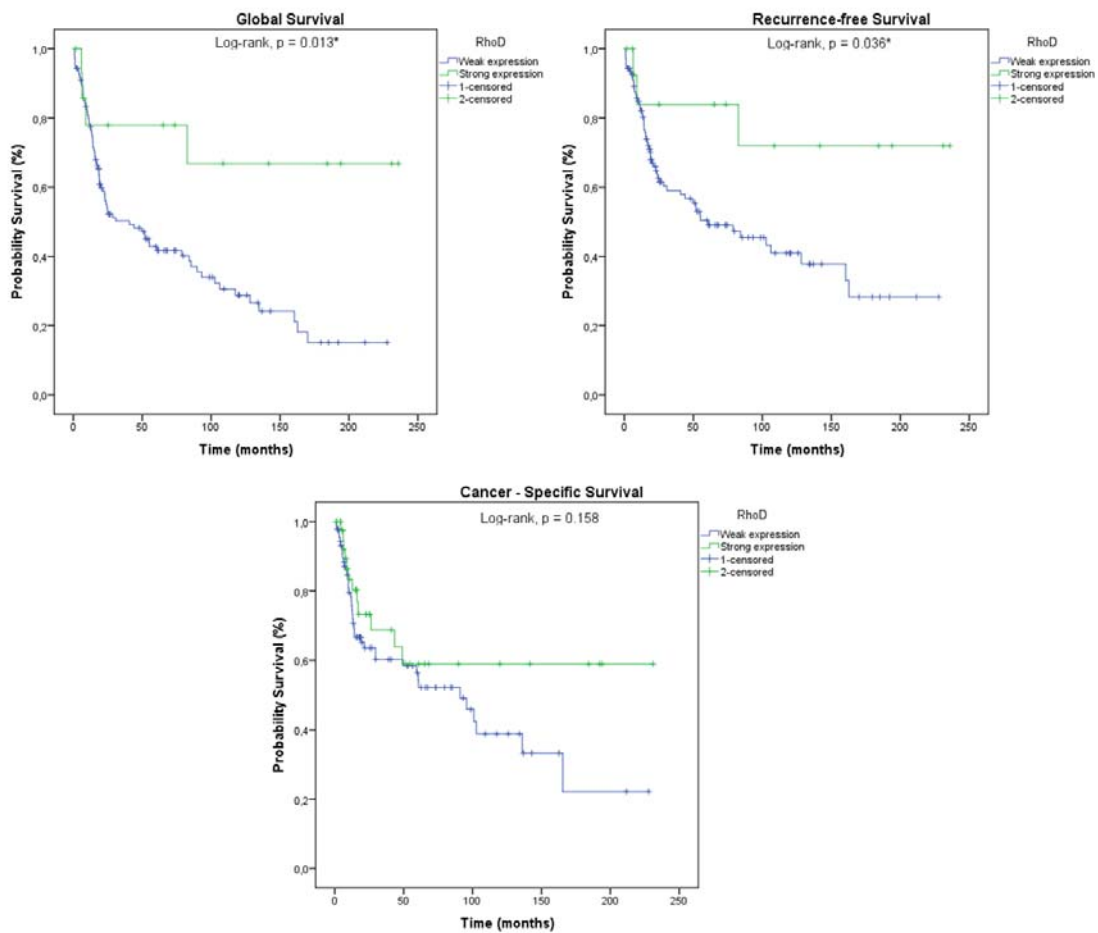


Figure 5. Overall, recurrence-free and specific cancer survival curves for RhoD staining. Better global and recurrence-free survivals was observed in patients with increase expression of RhoD ($p= 0.013$, figure 4A; $p=0.036$, figure 4B; respective). There was no statistical with specific cancer survival ($p= 0.058$, figure 4C). *Statistically significant, $p<0.05$.



CONCLUSÃO

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”**

(Marthin Luther King)

4 CONCLUSÕES

- ✓ ROCK1 foi correlacionado com melhor prognóstico no câncer de vulva, contrariando muitos trabalhos envolvendo diferentes tumores que associam sua expressão a maior agressividade tumoral, considerando-o como um possível alvo terapêutico.
- ✓ Ganho no número de cópias de ROCK1 foi detectado em 42.9% das amostras de VSCC, porém esse resultado não foi replicado nos ensaios de RT-PCR e IHQ, já que os mesmos apresentaram maior expressão nas amostras normais do que nas amostras tumorais.
- ✓ A maior imunomarcação de ROCK1 foi associada a maior sobrevida, (tanto livre de doença quanto câncer específica), à ausência de metástase linfonodal e a menor profundidade de invasão, mostrando seu papel de marcador de bom prognóstico nesta neoplasia.
- ✓ A expressão aumentada de RhoD foi correlacionada com melhor sobrevida, ausência de invasão perineural, vascular e linfática e com a menor profundidade de invasão. Além disso, a expressão de RhoD é maior nos tumores do que nas amostras adjacentes normais. Esses resultados nos revelam que RhoD pode ser considerado um marcador de bom prognóstico para VSCC.
- ✓ Portanto, esses achados corroboram os principais trabalhos publicados sobre RhoD, que relacionaram essa proteína com a interferência na migração celular.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 4ª ed. São Paulo: ARTMED; 2006. Citoesqueleto e comportamento celular. p.968-82.

Allen DG, Hutchins AM, Hammet F, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridisation in vulvar cancers. **Br J Cancer** 2002; 86:924-8.

Baiocchi G, Rocha RM. Vulvar cancer surgery. **Curr Opin Obstet Gynecol** 2014; 26:9-17

Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P: Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes. **Mol Biol Evol** 2007; 24:203-16.

Brennan DJ, O'Connor DP, Rexhepaj E, Ponten F, Gallagher WM. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:605-17.

Bryndorf T, Kirchhoff M, Larsen J, et al. The Most Common Chromosome Aberration Detected by High-Resolution Comparative Genomic Hybridization in Vulvar Intraepithelial Neoplasia Is Not Seen in Vulvar Squamous Cell Carcinoma. **Cytogenet Genome Res** 2004; 106:43-8.

Cintra RLG, Martins OV. **Ginecologia oncológica**. Porto Alegre: Atheneu; 1999. Câncer de vulva, p.266-82.

Coelho FRG, Costa RLR. **Padronização em ginecologia oncológica**. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2005. p.61-74.

Crum CP, Granter SR. Squamous neoplasia of the vulva. In: Crum CP, Lee KR, editors. **Diagnostic gynecologic and obstetric pathology**. Philadelphia: WB Saunders; 2006. p.109-148.

de Melo Maia B, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, et al. Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside. **J Transl Med** 2012; 10:150.

Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **Int J Cancer** 2004; 109:157-62.

FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. **Int J Gynecol Obstet** 2014; 125:97-8.

Figueiredo EMA. **Ginecologia Oncológica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. Câncer da Vulva; p.117-22.

Gad AKB, Ronnlund D, Spaar A, et al. Rho GTPases link cellular contractile force to the density and distribution of nanoscale adhesions. **FASEB Journal** 2012; 26:2374-82.

Hacker NF. Vulvar cancer. In: Berek JS, Hacker NF, editors. **Berek and Hacker's gynecologic oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2009. p.536-75.

Hall A. Rho family GTPases. **Biochem Soc Trans** 2012; 40:1378-82.

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of Change in Gene Copy Number. **Nat Rev Genet** 2009; 10:551-64.

Huang FY, Kwok YK, Lau ET, Tang MH, Ng TY, Ngan HY. Genetic Abnormalities and HPV Status in Cervical and Vulvar Squamous Cell Carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 157:42-8.

Huang N, Shah PK, Li C. Lessons from a Decade of Integrating Cancer Copy Number Alterations with Gene Expression Profiles. **Brief Bioinform** 2011; 13:305-16.

Jank T, Pack U, Giesemann T, Schmidt G, Aktories K. Exchange of a single amino acid switches the substrate properties of RhoA and RhoD toward glucosylating and transglutaminating Toxin. **J Biol Chemistr** 2006; 281:19527-35.

Jee KJ, Kim YT, Kim KR, Kim HS, Yan A, Knuutila S. Loss in 3p and 4p and Gain of 3q Are Concomitant Aberrations in Squamous Cell Carcinoma of the Vulva. **Mod Pathol** 2001; 14:377-81.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Aparelho Reprodutor feminino. p.448.

Knuutila S, Aalto Y, Autio K, et al. DNA copy number losses in human neoplasms. **Am J Pathol** 1999; 155:683-94.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. O sistema genital feminino e a mama. In: Montag A, Kumar V. **Robbins: patologia básica**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2008. p.776-779.

Kunjoonju JP, Raitanen M, Grénman S, Tiwari N, Worsham MJ. Identification of individual genes altered in squamous cell carcinoma of the vulva. **Genes Chromosomes Cancer** 2005; 44:185-93.

Kyrkou A, Soufi M, Bahtz R, et al. The RhoD to centrosomal duplication. **Small GTPases** 2013a; 4:1-7.

Kyrkou A, Soufi M, Bahtz R, et al. RhoD participates in the regulation of cell-cycle progression and centrosome duplication. **Oncogene** 2013b; 32:1831-42.

Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. **Int J Oncol** 2008; 33:585-93.

Lazo PA, Gallego MI, Ballester S, Feduchi E. Genetic alterations by human papillomaviruses in oncogenesis. **FEBS Lett** 1992; 300:109-13.

Liu X, Choy E, Hornicek FJ, et al. ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. **J Orthop Res** 2011; 29:1259-66.

Lobert VH, Stenmark H. Cell polarity and migration: emerging role for the endosomal sorting machinery. **Physiology** 2011; 26:171-80.

Lock FE, Ryan KR, Poulter NS, Parsons M, Hotchin NA. Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2. **PLoS One** 2012; 7:e31423.

Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. **Eur J Hum Genet** 2006; 14:139-48.

McClatchey AI. Modeling metastasis in the mouse. **Oncogene** 1999; 18:5334-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Moorman JP, Luu D, Wickham J, Bobak DA, Hahn CS. A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival. **Oncogene** 1999; 18:47-57.

Moore DH, Koh Wui-jin, Mcguire WP, Wilkinson EJ. Vulva. In: Barakat R, Markman M, Randall M, editors. **Principles and practice of gynecologic oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2009. p.555-90.

Murali A, Rajalingam K. Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. **Cell Mol Life Sci** 2014; 71:1703-21.

[NCI] National Cancer Institute. **SEER stat fact sheets: vulvar cancer**. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html.vulva.html>> [2014 nov 20].

Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, et al. Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells. **Mol Cancer** 2011; 10:79.

Nehru V, Almeida FN, Aspenström P: Interaction of RhoD and ZIP kinase actin filament assembly and focal adhesion dynamics. **Biochem Biophys Res Commun** 2013; 433:163-9.

Orlando KA, Stone NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. **Exp Cell Res** 2006; 312:5-15.

Pinto A. Etiopatogenia do câncer vulvar. **J Bras Patol Med Lab** 2002; 38:55-63.

Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. **Dev Biol** 2004; 265:23-32.

Raitanen M, Worsham MJ, Lakkala T, et al. Characterization of 10 vulvar carcinoma cell lines by karyotyping, comparative genomic hybridization and flow cytometry. **Gynecol Oncol** 2004; 93:155-63.

Ricci MD, Piato JRM, Piato S, Pinotti JA. **Oncologia ginecologica: aspectos atuais do diagnóstico e do tratamento**. São Paulo: Manole; 2008. Câncer vulvar; p.107-26.

Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, et al. Rho family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. **J Biol Chem** 2008; 283:25150-63.

Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, de M Maia B, et al. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV. **Br J Cancer** 2013; 109:184-94.

Siriaunkgul S, Settakorn J, Sukpan K, et al. HPV detection and genotyping in vulvar squamous cell carcinoma in northern Thailand. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:3773-8.

Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP. Rho-Kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 269:652-9.

Standring S, Borley NR, Collins P, et al. **Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice**. 40th ed. London: Elsevier; 2008. Female reproductive system; p.1279-304.

Stephen JK, Chen KM, Raitanen M, Grénman S, Worsham MJ. DNA Hypermethylation profiles in squamous cell carcinoma of the vulva. **Int J Gynecol Pathol** 2009; 28:63-75.

Swanson GP, Dobin SM, Arber JM, Arber DA, Capen CV, Diaz JA. Chromosome 11 abnormalities in bowen disease of the vulva. **Cancer Genet Cytogenet** 1997; 93:109-14.

Symons M, Rusk N. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. **Curr Biol** 2003; 13:409-18.

Tang AT, Campbell WB, Nithipatikom K. ROCK1 Feedback Regulation of the Upstream Small GTPase RhoA. **Cellular Signalling** 2012; 24: 1375-1380.

Teixeira MR, Kristensen GB, Abeler VM, Heim S. Karyotypic finding in tumors of the vulva and vagina. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 111:87-91.

Thibodeau GA, Patton KT. **Anatomy & physiology**. 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007. Female reproductive system; p.1138.

Tsubakimoto K, Matsumoto K, Abe H, et al. Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis. **Oncogene** 1999; 18:2431-40.

van der Veken LT and Buijs A. Array CGH in human leukemia: from somatics to genetics. **Cytogenet Genome Res** 2011; 135:260-70.

Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Lett** 2008; 582:2093-101.

Vigil D, Kim TY, Plachco A, et al. ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion. **Cancer Res** 2012; 72:5338-47.

Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. Regulation of microtubules in cell migration. **Trends Cell Biol** 2005; 15:76-83.

Weinberg RA. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed; 2008. Pequenas GTPases tipo-Ras controlam processos celulares incluindo adesão, forma celular e mobilidade; p.624-31.

Wills A, Obermair A. A review of complications associated with the surgical treatment of vulvar cancer. **Gynecol Oncol** 2013; 131:467-79.

Woelber L, Kock L, Giesecking F, et al. Clinical management of primary vulvar cancer. **Eur J Cancer** 2011; 47:2315-21.

Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. **Anticancer Res** 2009; 29:119-23.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:342-50.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 04 de junho de 2012.

Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha.

Aluna: Erica Mie Akagi (Doutorado).


Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1672/12
“Estudo de genes diferencialmente expressos em câncer de vulva: validações a partir de resultados de CGH array”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 29/05/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 06 de fevereiro de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedades das Informações Geradas;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1