

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE TRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E SUA CORRELAÇÃO
COM TIPOS VIRAIS DE HPV E TERAPIA EM
CARCINOMAS VULVARES**

IARA SANT'ANA RODRIGUES

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rodrigues, Iara Sant'ana

Avaliação do processo de transição epitélio-mesênquima e sua correlação com tipos virais de HPV e terapia em carcinomas vulvares

/ Iara Sant'ana Rodrigues – São Paulo, 2014.

146p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL 2. NEOPLASIAS VULVARES/diagnóstico. 3. PROGNÓSTICO. 4. INFECÇÕES POR PAPILLOMAVIRUS/patologia. 5. SERINA-TREONINA QUINASES TOR/efeito de droga.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
às mulheres essenciais na minha vida,
Aparecida, Marli, Ieda e Marlene por me lembrar
que o mais importante na vida não é a conquista,
mas sim o caminho percorrido*

AGRADECIMENTOS

É com grande satisfação que escrevo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, me ajudaram a alcançar mais esta etapa da minha vida. Muito obrigada:

Ao meu orientador Prof. Dr. **Rafael Malagoli Rocha** por acreditar na minha capacidade, pelo exemplo como ser humano e por toda a estrutura oferecida para a realização deste e de outros trabalhos. Obrigada pelos seus conselhos e amizade durante esses quatro anos.

Ao Prof. Dr. **Fernando Augusto Soares**, meu co-orientador, pelos ensinamentos na área de patologia dos tumores.

Ao Prof. **Dr. Fernando Schmit** - Institute of Pathology and Molecular Immunology of Porto University, por sua confiança em ter me aceitado como sua aluna durante seis meses em Portugal. Obrigada por suas críticas, correções, sugestões e ensinamentos.

Ao Dr. **Glauco Baiocchi**, pela disponibilidade e colaboração com ensinamentos na área de câncer vulvar.

A **Mônica MA Stiepcich**, Instituto Fleury, pelos ensinamentos na área de morfologia e colaboração na conclusão dos trabalhos.

A todos os colegas do grupo Molecular Morphology, atuais ou antigos, por colaborar para um bom resultado. Em especial **Fernanda Carvalho**, pelos conselhos, amizade, inúmeras ajudas e “toques” extras essenciais para o meu crescimento profissional, além de dividir momentos de sucessos e insucessos relativos à tese.

Ao Laboratório BCM, **Michele, Tiago, Gabriela, Martin, Bianca, Antuani**, e em especial **Marcos, Fernanda, Tonielli e Bruna** pela paciência, doação de tempo, espaço, material, conselhos e imensa ajuda nos experimentos.

A Prof.^a Dra **Vilma Martins** pela excelente infraestrutura que possibilitou a realização dos experimentos e doação de material.

A **Juliana Laino** pela sua disposição, esforço e colaboração para inúmeros experimentos, além da amizade e conselhos.

Gostaria de agradecer também aos amigos do grupo Neogene e Oncogenética, as pessoas mais fantásticas que já conheci. Um pessoal companheiro, divertido, inteligente. Amigos para todas as ocasiões, desde um papo furado até as maiores furadas destacando, **Fernanda Fortes, Priscila, Karina e Graziela.**

Ao **Mateus de Camargo Barros**, pela valiosa ajuda no uso do programa de estatística e por estar sempre de prontidão para toda e qualquer dúvida.

Ao **Fábio Marchi**, pela constante disposição em ajudar, principalmente, com figuras e gráficos, pela amizade e participação com ideias e sugestões.

Ao **José Roberto Ferreira**, pelo companheirismo, apoio emocional e por ser fundamental na organização dos resultados.

Aos amigos **Déborah, Juliano Jampietro, Felipe Fidalgo, Julia Melo e Cecília Feio** por terem se tornado grandes companheiros, não apenas na pesquisa. Não tenho palavras, mas talvez histórias e muitas risadas, para expressar o carinho que tenho por vocês.

A todos do Laboratório Cancer Genetics – Institute of Pathology and Molecular Immunology of Porto University, em especial com os quais passei a maior parte do tempo dividindo momentos tanto profissionais quanto pessoais, além da grande experiência de estar fora do meu país: **Rita, André Vieira, Madalena, Diana, Ana Margarida, Bárbara, Cristina Madureira, Daniel Ferreira, Nair Lopes e Arian.**

Gostaria de agradecer ao **Danilo, Felipe, Hidelgado, Ivan Neves, Fátima, Simone, Severino e Carlinhos** pelo apoio técnico e amizade.

As funcionárias **Patrícia, Vanessa, Genice e Liliane** por nunca negarem ajudas de qualquer espécie, sempre com simpatia.

A todos os funcionários da pós-graduação e da biblioteca pelo carinho e prestatividade.

Aos colegas do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino, que me acolheu com tanta cordialidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro que permitiu o meu estágio de doutorado sanduíche em Portugal.

A minha família, que mesmo distante me passa energia positiva para a realização dos meus objetivos. Sempre torcendo pra tudo dar certo. Aos meus pais, irmã e avó, a amizade de vocês foi capaz de nutrir a minha alma com coragem e esperança. Gostaria de agradecer de maneira especial as minhas tias, Marlene e Laurinda, mulheres de grande valia, que sempre facilitaram minha vida na cozinha, preparando marmitas para a semana toda. Amos muito vocês.

“Ser amigo é interpretar olhares, entender silêncios, perdoar erros, compartilhar emoções, guardar segredos, não deixar cair e secar lágrimas” .

RESUMO

Rodrigues IS. **Avaliação do processo de transição epitélio-mesênquima e sua correlação com tipos virais de HPV e terapia em carcinomas vulvares.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma de células escamosas da vulva compreende 92% de todos os tipos de câncer vulvar invasivo e corresponde a cerca de 3% a 5% dos tumores malignos do trato genital feminino. A transição epitélio mesênquima (TEM) é um importante evento durante a progressão do câncer e é induzida via ativação de fatores de transcrição como *TWIST*, *SNAI2* e *SNAI1* que modulam a expressão de E-caderina, Vimentina e β -catenina. Entretanto, para o carcinoma vulvar pouco se sabe sobre a relação da TEM com a presença de tipos específicos de papiloma vírus humano (HPV), fatores prognósticos e terapia. Mediante tal contexto, os objetivos do presente estudo foram identificar as alterações de expressão proteica de marcadores de transição epitélio-mesênquima (TEM) comparando centro e frente do tumor e correlacionar os resultados com a presença de infecção por subtipos específicos de HPV para a determinação de valores prognósticos e preditivos em carcinoma de vulva. Também realizamos ensaios *in vitro* para observar o efeito de NVP-BEZ235, um composto que age indiretamente em fatores de transcrição como o Slug, em uma linhagem metastática de vulva. Nossos resultados demonstraram que a perda de expressão de E-caderina é observada em estágios avançados de invasão tumoral enquanto que β -catenina representa um biomarcador importante para estabelecer o prognóstico no carcinoma vulvar ($p=0.044$). Além disso, a perda de expressão de β -catenina associada ao aumento de expressão de Slug no frente de invasão caracteriza um subgrupo de tumores com fenótipo de TEM relacionados com a negatividade para infecção pelo HPV com o pior prognóstico ($p = 0,001$). No cenário clínico, a avaliação de imuno-

histoquímica comparativa da expressão de β -catenina entre frente de invasão e centro do tumor, pode representar uma ferramenta adicional para estabelecer o prognóstico de carcinoma vulvar. Evidenciamos ainda que o composto NVP-BEZ235 foi capaz de diminuir o processo de migração, invasão e proliferação em linhagem metastática de carcinoma vulvar, que apresentava um fenótipo de EMT e, assim, representa um potencial alvo terapêutico para o tratamento de tumores mais agressivos, que não respondem bem aos tratamentos convencionais. Apoio financeiro: FAPESP, processo nº 12/15169-8.

SUMMARY

Rodrigues IS. **[Evaluation of the epithelial mesenchymal transition process and its correlation with viral HPV types and therapy in vulvar carcinomas]**. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Vulvar squamous cell carcinoma comprises 92% of all cases of vulvar cancer and accounts for about 3% to 5% of malignant tumors of the female genital tract. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an important event during cancer progression and it is induced by activation of transcription factors as *TWIST*, *SNAI2* and *SNAIL* factor that modulate the expression of E-cadherin, Vimentin and B-catenin. However, considering vulvar carcinoma, little is known about the relationship among EMT, presence of specific types of human papillomavirus (HPV), prognostic factors and therapy. In this context, the aims of this study were to analyze expression of markers of EMT comparing invasive front and central tumor and correlate the results with the presence of specific subtypes of HPV for determination of prognostic and predictive factors in vulvar carcinoma. And also we performed *in vitro* assays to observe the effect of NVP-BEZ235, a compound that acts indirectly on transcription factors such as Slug on a metastatic vulvar cancer cell line. Our results demonstrated that loss of E-cadherin expression is observed in advanced stages of tumor invasion whereas β -catenin is an important biomarker for establishing the prognosis in vulvar carcinoma ($p=0.044$). Furthermore, β -catenin low expression associated with gain in Slug expression at the invasive front characterizes a subgroup of EMT-related HPV-negative tumors with the worst outcome, increased invasiveness and progression ($p= 0.001$). In the clinical setting, IHC comparative assessment of β -catenin expression between invasive front and central tumor may represent an additional tool for establishing prognosis of vulvar cancer. We also showed that NVP-BEZ235 decreased the migration, invasion and

proliferation of metastatic vulvar cancer cell line that presents an EMT-like that represents a potential therapeutic target for the treatment of aggressive tumors, which often do not respond to conventional treatments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características adquiridas pelas células neoplásicas.....	3
Figura 2	Diagrama da anatomia da vulva.....	5
Figura 3	Tipos histológicos de carcinoma de células escamosas da vulva.....	9
Figura 4	Diagrama com os vários caminhos patogénéticos do CEC.....	10
Figura 5	Reversibilidade de EMT.....	26
Figura 6	Sinais que iniciam a EMT.....	29
Figura 7	Processo de EMT e suas mudanças moleculares.....	36
Figura 8	Esquema das vias de transdução de sinal associada com EMT.....	37
Figura 9	Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e relevantes drogas que têm como alvo cada um dos componentes da via.....	41
Figura 10	Estrutura química do composto NVP-BEZ235.....	42

LISTA DE TABELA E QUADRO

Tabela 1	Tipos de Câncer Vulvar.....	6
Quadro 1	Estadiamento FIGO para carcinoma de vulva (2009).....	18

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AKT	<i>Protein kinase B / Proteína quinase B</i>
Anova	<i>Analysis of variance / Análise de Variância</i>
AP1	<i>Activator protein 1 / Proteína ativadora 1</i>
APC	<i>Adenomatous poliposis coli / Polipose coli adenomatosa</i>
5AzaC	<i>5- Azacytidine / 5-aza-2-deoxicitina</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter / Antagonista BCL2 de morte celular</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin / Albumina Bovina</i>
CDH1	<i>Cadherin-1 / Caderina 1, tipo 1</i>
CEC	<i>Vulva squamous cell carcinoma / Carcinoma de células escamosas da vulva</i>
CSF-1	<i>Colony stimulating factor 1 / Fator 1 estimulador de colônia</i>
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 / Catenina (gene associada caderina, beta 1)</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole / 4 ',6-diamino-2-fenilindol</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide / Dimetilsulfóxido</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucléico</i>
DSH	<i>Dishevelled / proteína Dishevelled</i>
E	<i>Early region / Região precoce</i>
4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 / Proteína 1 ligadora do fator inicial de transcrição 4E eucariótica</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor / Fator de crescimento epidermal</i>
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition / Transição epitélio-mesênquima</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase / Proteína cinase regulada por sinais extracelulares</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase / Proteína quinase de adesão focal</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor / Fator de crescimento de fibroblasto</i>

FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics / Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FOXO	<i>Forkhead box O</i> / Fator de transcrição “Forkhead” da família da FoxO
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i> / proteína quinase da glicogênio- 3beta
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> / Fator de crescimento hepático
HIF1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i> / Fator Indutor de Hipóxia-1
HPV	Human papillomavirus / Papilomavirus humano
INPP4B	<i>Inositol polyphosphate 4-phosphatase-II</i> / fosfatase Tipo II inositol 3,4- bifosfato
L	<i>Late region</i> / Região tardia
LCR	<i>Long control region</i> / Região longa de controle
LEF/TCF	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor/ T Cell-Specific</i> / Fator linfóide realçador de ligação /Fator de transcrição específico de células T
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> / Proteína quinase ativada por mitógeno
MET	<i>Mesenchymal epithelial transition</i> / Transição mesenquimal- epitelial
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> / Metaloproteinases da matriz
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucléico mensageiro
mTORC	<i>Mammalian target of rapamycin complex</i> / Alvo da rapamicina em mamíferos
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> / Oncogene homólogo ao V-myc myelocitomatose
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i> / Fator Nuclear Kappa B
NIV	<i>Vulvar intraepithelial neoplasia</i> / Neoplasia intraepitelial vulvar
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / Tampão fosfato-salino
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> / Fator de crescimento derivado das plaquetas

PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i> / Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol-1
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> / Paraformaldeído
PH	<i>Pleckstrin-homology domain</i> / Domínio contendo pleckstrina
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> / Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> / Fosfatidilinositol (4,5) - bifosfato
PIP3	<i>Phosphatidylinositol 4,5-triphosphate</i> / Fosfatidilinositol (3,4,5) - trifosfato
PRAS40	<i>Proline-rich Akt substrate</i> / Substrato de Akt rico em prolina
pRB	<i>Retinoblastoma protein</i> / Proteína do retinoblastoma
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> / Fosfatase e homólogo de angiotensina
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucléico
RPS6	<i>Ribosomal protein S6</i> / Proteína ribossomal S6
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel</i> / Gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato
sE-cad	<i>Soluble E-cadherin</i> / E-caderina solúvel
SLUG	<i>Zinc finger protein SNAI2 ou Protein snail homolog 2</i> / Proteína zinc finger SNAI2
SNAIL	<i>Zinc finger protein ou Protein snail homolog 1</i> / Proteína zinc finger SNAI1
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i> / Programa estatístico
S6	<i>Ribosomal Kinase/ Quinase Ribossômica S6</i>
STAT2	<i>Activator of transcription 2</i> / Transdutor de Sinal e Ativador da transcrição 2
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i> / Fator de transformação do crescimento beta
TNM	<i>Stage of tumor (T), presence of linfonodos and metastase</i> / Estadio do tumor primário (T), presença de linfonodos positivos (N) e metástase (M)

TWIST	<i>Family of basic-helix-loop- helix proteins transcription factor /</i> família bHLH fator de transcrição
URR	<i>Upstream regulatory region /</i> Região reguladora upstream
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor /</i> Fator de crescimento do endotélio vascular
VSCC	<i>Vulvar squamous cell carcinoma</i>
WNT	<i>Wingless</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Vulvar	4
1.1.1	Definição e Classificação.....	4
1.1.2	Carcinoma de células escamosas da vulva (CEC).....	6
1.2	Transição epitélio-mesênquima na progressão do câncer	23
1.2.1	Sinais do estroma que induzem a EMT	26
1.2.2	A EMT associada à perda de marcadores epiteliais e à aquisição de marcadores mesenquimais.....	29
1.2.3	EMT é programada por fatores de transcrição: TWIST, SNAIL e SNAIL2 (SLUG).....	34
1.3	Eventos de EMT no tratamento do câncer	36
1.3.1	A via de transdução de sinal PI3K: novos alvos terapêuticos.....	39
1.3.2	NVP-BEZ235	42
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo geral	45
2.2	Objetivos específicos.....	45
3	ARTIGOS	47
3.1	Artigo 1 - Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV	47
3.2	Artigo 2 - A dual PI3K/mTOR inhibitor as potential therapeutic option for vulvar cancer	86
4	CONCLUSÃO	123
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	125

ANEXOS

Anexo 1	Artigo 3
Anexo 2	Artigo 4
Anexo 3	Artigo 5
Anexo 4	Artigo 6
Anexo 5	Artigo 7
Anexo 6	Artigo 8
Anexo 7	Artigo 9
Anexo 8	Artigo 10

INTRODUÇÃO

*“Todos os seres humanos,
por natureza, desejam saber”.*

Aristóteles (384-321 a.C.)

1 INTRODUÇÃO

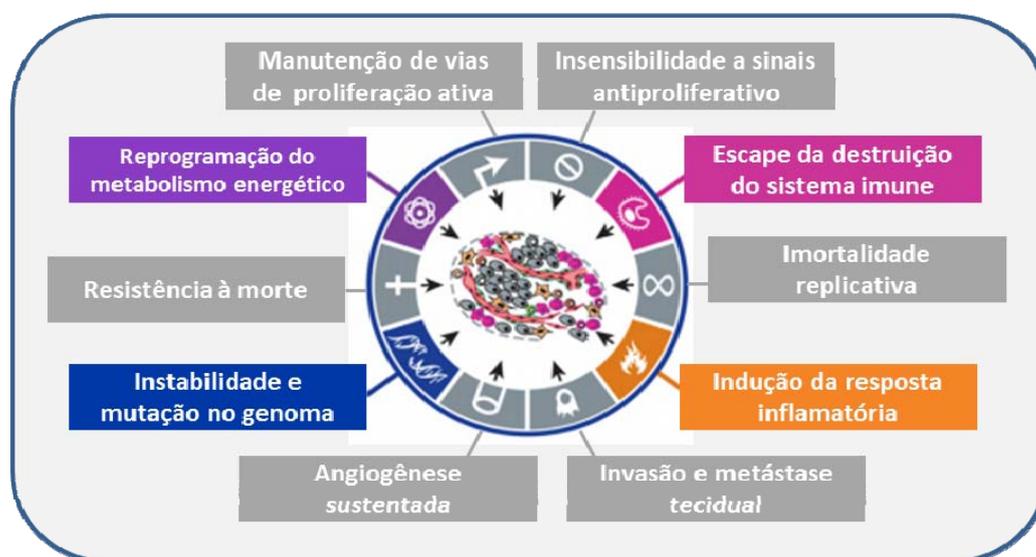
Existe um amplo consenso de que o câncer é, em sua essência, uma doença genética e devido à complexidade e à existência de vias alternativas no controle da proliferação, diferenciação e morte celular, é necessária a ocorrência de alterações aditivas, sucessivas e dinâmicas no genoma para que haja a formação de um tumor maligno. Cada nova alteração é acompanhada de uma nova onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma ou duas populações celulares com grande potencial de crescimento e invasão (FUTREAL et al. 2001).

Alterações que se acumulam no genoma podem surgir como consequência da exposição a carcinógenos químicos, físicos, e biológicos (ALBERTS et al. 2006) que afetam diferentes passos nas vias que regulam os processos de proliferação e homeostase celular (CONFORTI 2004).

Translocações cromossômicas, ampliações gênicas e mutações de ponto (KNUDSON 1985) estão entre as alterações presentes no genoma que podem levar à ativação de proto-oncogenes (ALBERTS et al. 2006). Além disso, outras alterações genéticas, como mutações pontuais e perdas alélicas ou metilação do DNA podem incidir sobre os genes supressores de tumor inativando-os e liberando a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem) (WEINBERG 2007). Assim, as células passam a proliferar de forma anômala, formando

uma massa de células desordenadas, que constitui um tumor (CONFORTI 2004).

Com o objetivo de adquirir mobilidade e invasividade, a massa de células neoplásicas se torna capaz de manter ativas as vias de sinalização proliferativa, evadir da destruição pelo sistema imune e resistir à morte celular (HANAHAN e WEINBERG 2000). Adicionalmente, a ocorrência de respostas inflamatórias, manutenção do microambiente tumoral, a instabilidade genômica e a reprogramação do metabolismo energético garantem a persistência desse fenótipo maligno (HANAHAN e WEINBERG 2011), permitindo a imortalidade replicativa, a indução da angiogênese, a invasão de tecidos adjacentes e a metástase, responsável por cerca de 90% das mortes relacionadas aos tumores (CHRISTOFORI 2006) (Figura 1).



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011).

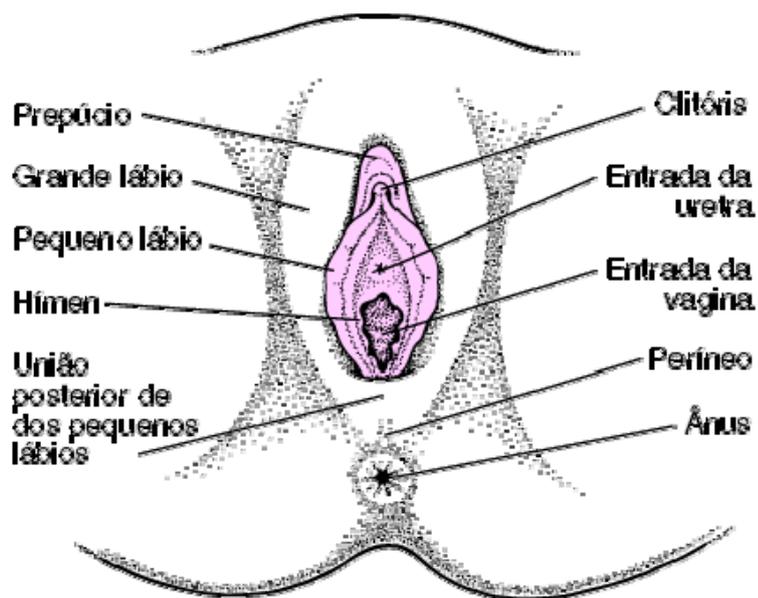
Figura 1 - Características adquiridas pelas células neoplásicas. Manutenção de vias de proliferação ativas, insensibilidade a sinais antiproliferativo, invasão e metástase tecidual, angiogênese sustentada e resistência à morte.

Apesar de não estarem claros os mecanismos moleculares envolvidos na aquisição das características das células neoplásicas, sabe-se que seu reconhecimento irá influenciar cada vez mais no estabelecimento de novos meios para o tratamento do câncer, principalmente para aqueles tumores em que a opção terapêutica é cirúrgica e extremamente agressiva, como os tumores de vulva, que é acompanhado por uma morbidade cirúrgica significativa (BUXANT et al. 2005; SOUEN 2006).

1.1 CÂNCER VULVAR

1.1.1 Definição e Classificação

A vulva refere-se aos órgãos genitais femininos externos, constituídos pelo monte pubiano, grandes e pequenos lábios, clitóris, hímen, vestíbulo da vagina, e a glândula vestibular maior (Figura 2) (FARIA 1999). Na região vulvar localizam as aberturas uretral e vaginal, sendo que o orifício anal está na região perineal próxima. A parte mais externa da vulva é recoberta por epitélio plano estratificado queratinizado que contém grande quantidade de folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas. Na face interna dos pequenos lábios, o epitélio é de transição com a característica de ser úmido e não pilificado estendendo-se até o epitélio mucoso vaginal (epitélio escamoso não queratinizado). Portanto, há na região vulvar epitélios com diferentes características histológicas que reagirão de maneira diferente aos diversos estímulos patogênicos (MARTINS 1999).



Fonte: Adaptado de American Cancer Society-ACS (2013).

Figura 2 - Diagrama da anatomia da vulva.

O câncer vulvar invasivo é pouco frequente, pode-se iniciar na pele, no subcutâneo, em elementos glandulares da vulva, ou na mucosa do intróito vaginal (STROUP et al. 2008; WANG et al. 2008).

Segundo BEREK e FERRARI (1989) este tumor pode ser classificado quanto:

- *ao aspecto clínico:* podem se apresentar de modo difuso ou circunscrito. A forma circunscrita pode ser: superficial, exofítica e endofítica.
- *à localização:* labial, clitoridiano ou lábio-clitoridiana, vestibular, com e sem comprometimento da uretra e bartoliniano.

- *ao tipo histológico*: escamoso; epitelial glandular-adenocarcinoma (Glândula de Bartholin); origem conjuntiva e formas mistas (sarcomas e carcinossarcomas) e carcinoma indiferenciado (Tabela 1).

Tabela 1 - Tipos de Câncer Vulvar.

Tipos Histológicos de Câncer Vulvar	Porcentagem
Escamoso	92
Melanoma	2-4
Basocelular	2-3
Glândula de Bartholin (adenocarcinoma, células transicionais, cístico adenóide)	1
Verrucoso	<1
Sarcoma	<1

Fonte: HOLSCHNEIDER e BEREK (2008).

Os tumores malignos de origem conjuntiva são pouco frequentes e representados pelos sarcomas e melanomas. Sendo os sarcomas oriundos geralmente do tecido conjuntivo da região e das terminações do ligamento redondo. Já os melanomas malignos são mais frequentes no clitóris e grandes lábios e são raros na região vestibular (BEREK e FERRARI 1989).

Os tumores de células escamosas representam a grande maioria (92%) dos tipos de câncer vulvar invasivo, destacando-se na prática clínica (HOLSCHNEIDER e BEREK 2008; KNOPP et al. 2006).

1.1.2 Carcinoma de células escamosas da vulva (CEC)

O CEC é uma neoplasia rara, representando cerca de 3% de todos os cânceres genitais em mulheres; aproximadamente dois terços ocorrem em mulheres acima de 60 anos (ROBBINS et al. 2008). Acomete

aproximadamente 0,5-1,5 por 100.000 mulheres/ano em países desenvolvidos, porém é 2-3 vezes mais frequente em países subdesenvolvidos (CREASMAN e HUH 2011). Segundo a *Internacional Agency for Research on Cancer - IARC* (1992), Recife (nordeste do país) aparece como uma das cidades com a maior incidência desta neoplasia no mundo, com uma taxa de 5,6/100.000 mulheres/ano (National Cancer Institute-NCI 2011).

Em termos de etiologia, patogenia e características histológicas, os carcinomas de células escamosas da vulva são divididos em dois grupos: carcinomas basalóides e verrucosos, relacionados à infecção por papilomavírus humanos (HPVs) de alto risco oncogênico (30% dos casos) e carcinomas de células escamosas queratinizantes; não relacionados à infecção por HPV (70% dos casos) (DE KONING et al. 2008).

Os carcinomas basalóides e verrucosos invasivos se desenvolvem a partir de uma lesão pré-cancerosa *in situ* chamada neoplasia intraepitelial vulvar clássica (NIV clássica). Essa forma de NIV apresenta-se como lesões distintas brancas (hiperqueratósicas), cor carne ou pigmentadas, discretamente elevadas. Carcinomas coexistentes podem ser exofíticos ou indurados, frequentemente com ulceração (ROBBINS et al. 2008). Ao exame histológico, os carcinomas basalóides mostram um tumor infiltrativo caracterizado por ninhos e cordões de células escamosas malignas pequenas, imaturas, agrupadas de modo compacto, podendo possuir focos de necrose central (ROBBINS et al. 2008); e os carcinomas verrucosos são caracterizados por arquitetura exofítica, papilar e atipia coilóitica

proeminente, com baixo risco de formação de metástases linfonodais, extensas faixas anastomosadas de células arranjadas de forma similar à lesão intra-epitelial, com células escamosas pleomórficas (CRUM e GRANTER 2006; MOORE et al. 2009) (Figura 3). Ocorre mais comumente em mulheres em idade reprodutiva e os fatores de risco são idade jovem na primeira relação sexual, múltiplos parceiros sexuais, parceiro do sexo masculino com múltiplas parceiras sexuais, uma vez que estas lesões estão relacionadas à infecção por HPV. A regressão espontânea de NIV foi relatada, geralmente em mulheres mais jovens. O risco de progressão para carcinoma invasivo é maior em mulheres acima de 45 anos de idade ou em mulheres com imunossupressão (ROBBINS et al. 2008) (Figura 4).

O carcinoma escamoso queratinizante apresenta notável maturação celular e ceratinização. As células da camada basal exibem atipia leve a moderada (Figura 3). Este tipo de tumor frequentemente surge em pacientes com idade média de 76 anos e presença de líquen escleroso ou hiperplasia de células escamosas de longa duração, estando associado à NIVs diferenciadas e dermatoses inflamatórias, sendo geralmente negativas para o HPV (CRUM 1992) (Figura 4). A emergência frequentemente sutil do câncer pode ser erroneamente interpretada como dermatite ou leucoplasia por um longo período de tempo (ROBBINS et al. 2008).

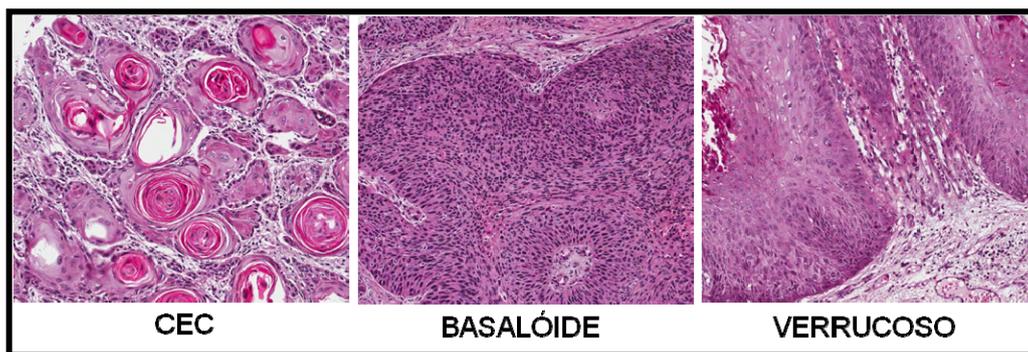
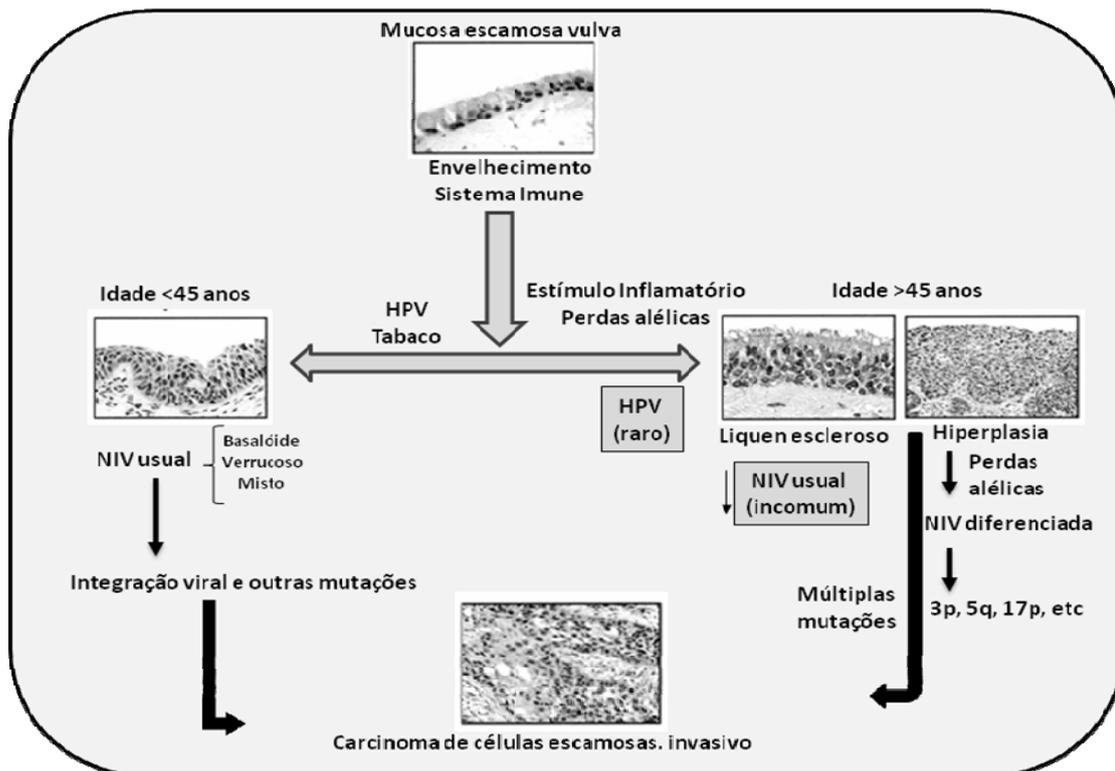


Figura 3 - Tipos histológicos de carcinoma de células escamosas da vulva.

Um relato de desequilíbrio alélico no líquen escleroso e na hiperplasia de células escamosas suporta a hipótese de que as duas condições representam um risco aumentado para a formação da neoplasia, apesar da ausência de evidências morfológicas de atipia. Foram relatados casos raros de líquen escleroso, NIV diferenciada e carcinoma adjacente com mutações idênticas no gene p53. Em geral, contudo, a mutação do gene p53 é um evento raro e um tanto tardio na carcinogênese vulvar (VANIN et al. 2002) (Figura 4).

O risco de desenvolvimento de câncer a partir de NIV é principalmente uma função da idade, extensão e estado imunológico (JONES et al. 2005).



Fonte: Adaptado de PINTO (2002).

Figura 4 - Diagrama com os vários caminhos patogênicos do CEC. NIV = neoplasia intra-epitelial vulvar.

A Papilomavírus humano como fator de risco para o CEC

Os papilomavírus humanos (HPV) correspondem a vírus pequenos de DNA de dupla fita que pertencem à família *Papillomaviridae* (DE VILLIERS et al. 2004). Até o momento foram descritos mais de 200 tipos de HPV, que são identificados e agrupados de acordo com o seu genótipo (STANLEY 2007).

O genoma viral possui oito genes e uma região não codificadora, também chamada região de controle longa – long control region, LCR, ou upstream regulatory region, URR – localizada nas duas fitas. A região LCR contém elementos reguladores da origem da replicação e da expressão de

genes reguladores da transcrição viral (BOOY et al. 1998). Embora ocorram variações no tamanho e na sequência dos genes e das LCRs entre os diferentes papilomavírus, todos têm a mesma organização genômica. A região precoce E (de “early region”) codifica várias proteínas – E1, E2, E4, E5, E6 e E7 – que regulam a transcrição e a replicação viral e controlam o ciclo celular, conferindo a esse vírus um potencial para transformar e immortalizar as células hospedeiras (DOORBAR e STERLING 2001). Na região chamada tardia L (de “late region”), localizam-se os genes L1 e L2, responsáveis pela imunogenicidade do vírus e carregam determinantes antigênicos epitélio-específicos (BAKER et al. 1991). Esses genes têm sequências altamente conservadas em todos os papilomavírus (BERNARD et al. 1994). Aproximadamente, 40 tipos de HPV infectam a região anogenital. Alguns destes genótipos virais estão envolvidos em mecanismos carcinogênicos, os chamados HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82), enquanto outros praticamente não possuem envolvimento com câncer e são chamados HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108) (SHUKLA et al. 2009).

Os papilomavírus são epitélios-específicos e têm tropismo pelo epitélio escamoso da pele e das mucosas. Seu ciclo biológico na pele ou nas mucosas tem início quando as partículas virais penetram nas células da camada profunda, que são as células menos diferenciadas do epitélio escamoso, e que ainda têm atividade mitótica. Fissuras nesse epitélio possibilitam o acesso do vírus a essas células, que após sua penetração

perde seu capsídeo, expondo seu DNA à ação de enzimas nucleares, favorecendo a expressão dos genes virais (EVANDER et al. 1997; MCMILLAN et al. 1999). O DNA do HPV pode permanecer quiescente na célula, antes ou depois de uma infecção produtiva. O genoma pode ficar, dentro do núcleo da célula, sob a forma circular, não integrado ao genoma celular (forma episomal). Nos estágios precoces da infecção, o DNA episomal replica-se, na camada basal, concomitantemente ao DNA celular, gerando de vinte a cinquenta cópias por célula. Nas infecções por tipos de HPV associados a cânceres cervicais é observada, com frequência, a integração do DNA do vírus a um cromossomo do hospedeiro (VILLA 1997), pela ruptura na região de E2 (DOORBAR e STERLING 2001).

Estudos da transcrição viral em linhagens de queratinócitos humanos, imortalizados por HPV-16 (DOORBAR et al. 1990; ROHLS et al. 1991), mostraram que os genes precoces são transcritos a partir de promotores, por *splicing* diferencial. Assim, vários RNAs são produzidos por meio de promotores diferentes. As proteínas traduzidas por esses RNAs mensageiros vão interferir na função de proteínas celulares que controlam o ciclo celular normal da célula, a diferenciação celular e a apoptose. A proteína E7 estimula a proliferação dos queratinócitos infectados, por sua ligação com fatores de transcrição AP1, levando à ativação de promotores que respondem à AP1. Além disso, atua na proliferação celular por sua associação com a pRb (proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma), que é um regulador negativo do ciclo celular na passagem de G1 para S. A proteína E6 também interfere na regulação do ciclo celular ao ligar-se a uma

proteína celular supressora de tumor e induzir a degradação de p53 (STOREY et al. 1998). Nos HPVs de alto risco, entretanto, a ação de E6, para a degradação de p53, é muito mais eficiente (DOORBAR e STERLING 2001).

No estágio produtivo do ciclo viral, a expressão de E7 parece reativar o mecanismo celular de replicação de DNA, para que ocorra a amplificação do genoma viral (FLORES et al. 2000), que irá compor novos vírions. A proteína E1, que tem atividade de helicase (YANG et al. 1993), parece iniciar a replicação do epissoma viral. Além disso, uma proteína E1^{E4}, produzida a partir de um RNA transcrito de um pequeno trecho C-terminal de E1 que se funde com um transcrito de E4, precede a síntese das proteínas do capsídeo. Estudos sugerem que sua função pode ser a de facilitar a produção do vírus, talvez pela inibição da apoptose, ou pelo estímulo à replicação do DNA viral (DOORBAR et al. 1990). As proteínas L1 e L2, depois de sintetizadas no citoplasma, são direcionadas para o núcleo da célula, onde ocorre a montagem das novas partículas, nas camadas mais superficiais do epitélio (VILLA 1997). A liberação das partículas virais ocorre na superfície da lesão, durante a descamação celular.

Apesar da relação causal bem estabelecida entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de câncer cervical, demonstrada por estudos epidemiológicos e moleculares, apenas uma relação mais fraca é observada entre o vírus e outros tipos de câncer, tais como câncer de vulva, ânus e pênis (ZUR HAUSEN et al. 2009).

O impacto exato da presença do HPV no câncer de vulva é incerto, pois as taxas de prevalência deste vírus são divergentes entre a literatura. Dezesesseis estudos compreendendo 1.181 pacientes com carcinoma epidermóide vulvar demonstraram, em média, 35% de positividade para HPV16 e 25% de positividade para HPV18 (RUSK et al. 1991; TOKI et al. 1991; HORDING et al. 1994; MONK et al. 1995; TRIMBLE et al. 1996; IWASAWA et al. 1997; KAGIE et al. 1997; LERMA et al. 1999; PINTO et al. 1999; SCURRY et al. 1999; RIETHDORF et al. 2004; HAMPL et al. 2006; SANTOS et al. 2006; SKAPA et al. 2007; SUTTON et al. 2008). Em um estudo populacional chinês, a presença do HPV foi detectada em 48% (23/48) dos casos de carcinoma de células escamosas, se assemelhando com outros estudos que demonstraram uma variação de 31-58% das pacientes infectadas (BLOSS et al. 1991; TOKI et al. 1991; ANSINK et al. 1994; LEE et al. 1994).

A presença do HPV parece ter papel nos primeiros eventos da etapa da carcinogênese vulvar, a integração do vírus ao genoma da célula hospedeira desencadeia a progressão de displasias no tecido (HILLEMANN e WANG 2006). Porém, o mecanismo de indução e promoção tumoral do carcinoma vulvar causado pelo HPV ainda não está totalmente elucidado. Em áreas, como a região de cabeça e pescoço, tumores HPV-positivos têm mostrado consistentemente melhor prognósticos do que neoplasias HPV-negativos. Essa taxa de sobrevida maior dos tumores HPV-positivos tem sido relatada anteriormente em tumores da orofaringe e sinonasal e foi relacionada a uma melhor resposta à

quimioterapia e radioterapia (LI et al. 2003; FAKHRY et al. 2008; ALOS et al. 2009; LASSEN et al. 2009). Não se sabe se os tumores vulvares HPV-positivo têm um prognóstico melhor e se eles compartilham como nos tumores de cabeça e pescoço HPV-positivos uma melhor resposta à quimioterapia e radioterapia. Além disso, é importante ressaltar, que as infecções por HPV isoladamente não são capazes de induzir progressão para neoplasia invasora. Apenas 2% das lesões induzidas por esse vírus evoluirão para invasão, demonstrando que são necessários outros eventos moleculares para o surgimento do fenótipo invasivo (SILVA et al. 2004).

B Diagnóstico do CEC

A maioria das pacientes apresenta nódulo ou massa vulvar, embora muitas vezes acompanhado por uma longa história de prurido, geralmente associada a uma distrofia vulvar (HACKER 2009; DE MELO MAIA et al. 2013).

No exame físico, a lesão geralmente é elevada e pode ser consistente, ulcerada, leucoplásica, ou verrugosa na aparência. Lesões verrugosas são muitas vezes inicialmente diagnosticadas como condiloma acuminado (HACKER 2009).

Carcinomas de células escamosas da vulva podem ocorrer em grandes lábios, entretanto os pequenos lábios, clitóris e períneo também têm sido considerados sítios primários. Aproximadamente 10% dos casos são demasiadamente extensos para determinar um local de origem, e cerca de 5% dos casos são multifocais (HACKER 2009). DE MELO MAIA et al (2013)

observaram que a maioria dos tumores (72,20%) afetaram a região vulvar de forma unilateral. Apenas 20% dos tumores foram bilaterais, 4,74% estavam localizados centralmente, e 2,71% afetada a linha média da vulva.

Aproximadamente 40% das pacientes com esta neoplasia não são diagnosticadas até que a doença atinja estádios avançados. Essa falha no diagnóstico torna-se mais significativa quando se comparam os progressos no conhecimento da etiologia e etiopatogenia do câncer vulvar. Considerando que este tumor é uma doença da superfície da pele, espera-se que o diagnóstico seja precoce, entretanto, a maioria dos casos é diagnosticada quando os sinais e sintomas já estão presentes por mais de um ano (DE MELO MAIA et al. 2013).

O diagnóstico requer biópsia (fragmento de tecido retirado da lesão suspeita), que deve incluir a derme subjacente e tecido conjuntivo, de modo que o patologista possa avaliar adequadamente a profundidade e natureza da invasão estromal. É preferível deixar a lesão primária *in situ*, se possível, para permitir o tratamento adequado (HACKER 2009).

C Estadiamento do CEC

O sistema de estadiamento clínico baseado na classificação TNM foi adotado pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), em 1969, tendo como base uma avaliação clínica do tumor primário e linfonodos regionais e uma busca limitada de metástases à distância (HACKER 2009). Entretanto, essa avaliação é imprecisa em 25% a 30% dos casos. Metástases microscópicas podem estar presentes em gânglios que

não são clinicamente suspeitos, e gânglios suspeitos podem estar expandidos devidos, apenas, à inflamação (HOMESLEY et al. 1991). Desta forma, em 1988, o Comitê da FIGO introduziu um sistema de estadiamento cirúrgico modificado para o carcinoma de vulva (HACKER 2009).

A frequente discrepância entre o estadiamento clínico e os achados cirúrgico-patológicos levou a FIGO e American Joint Committee on Cancer a atualizarem a classificação, correlacionando o sistema FIGO com o TNM (Quadro 1) (PECORELLI 2009), levando em consideração o acometimento linfonodal (MOORE et al. 2009; HACKER 2009).

Quadro 1 - Estadiamento FIGO para carcinoma de vulva (2009).

Estádio FIGO	Achados Clínicos/Patológicos
Estádio I	Tumor confinado na vulva
IA	Lesões ≤ 2 cm na maior dimensão, confinadas a vulva ou períneo e com invasão estromal ≤ 1.0 mm*, sem metástase linfonodal
IB	Lesões > 2 cm na maior dimensão com invasão estromal >1.0 mm*, confinada na vulva ou períneo, com nódulos negativos
Estádio II	Tumor de qualquer tamanho com disseminação adjacente (1/3 uretra inferior, 1/3 vagina, ânus); sem metástase linfonodal
Estádio III	Tumor de qualquer tamanho com ou sem disseminação adjacente (1/3 uretra inferior, 1/3 vagina, ânus) com metástase linfonodal inguino-femoral
IIIA	(i) 1 linfonodo acometido (≥5 mm)
IIIB	(ii) 1-2 linfonodo(s) acometido(s) (<5 mm)
IIIC	(i) 2 ou mais metástase linfonodais (≥5 mm)
Estádio IV	(ii) 3 ou mais metástase linfonodais (<5 mm)
IVA	Linfonodos positivos com disseminação extra-capsular
IVB	Tumor invade outras estruturas regionais (2/3 uretra superior, 2/3 vagina) ou estruturas distantes
	Tumor que invade qualquer uma das seguintes regiões:
	(i) uretra superior e/ou mucosa vaginal, mucosa da bexiga, mucosa retal, ou fixação ao osso pélvico
	(ii) linfonodos inguino-femorais fixos ou ulcerados
	Qualquer metástase à distância incluindo linfonodos pélvicos
Sistema TNM	
Tis	As células cancerígenas estão in situ
T1	O tumor está limitado à vulva ou períneo.
T1a	O tumor tem até 2cm de diâmetro.
T1b	O tumor tem mais do que 2 cm de diâmetro.
T2	O tumor pode ser de qualquer tamanho e está crescendo no ânus ou no 1/3 inferior da vagina ou da uretra.
T3	O tumor pode ter qualquer tamanho e está crescendo na parte superior da uretra, bexiga, reto ou osso púbico.
N0	Ausência de linfonodo comprometido.
N1	Disseminação para ≤ 2 linfonodos da virilha
N1a	Disseminação para ≤ 2 linfonodos e as áreas de disseminação estão a menos de 5 mm
N1b	Disseminação para um linfonodo e a área de disseminação está dentro de 5 mm ou mais
N2	Disseminação para >2 linfonodos da virilha
N2a	Disseminação ≥3 linfonodos, mas cada área de disseminação é < 5 mm
N2b	Disseminação ≥3 linfonodos, mas cada área de disseminação é > 5 mm
N2c	Disseminação para os linfonodos e extracapsular
N3	Disseminação para os linfonodos, causando úlceras ou fazendo com que o linfonodo fique preso ao tecido abaixo
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

*A profundidade de invasão é definida como a medida do tumor a partir da junção epitélio-estromal da papila dérmica adjacente mais superficial para o ponto mais profundo de invasão.

Fonte: Adaptado de PECORELLI (2009).

D Vias de disseminação do CEC

A disseminação do CEC pode ocorrer por três vias: extensão direta, que envolve estruturas adjacentes, como a vagina, uretra e ânus; por meio de embolização linfática, que atinge os linfonodos regionais; e por disseminação hematogênica, para locais distantes, incluindo os pulmões, o fígado e os ossos (HACKER 2009).

Metástases linfáticas podem ocorrer no início da doença. Inicialmente, a disseminação é para os linfonodos inguinais, que estão localizados entre a fáscia de Camper e a fáscia lata. A partir desses linfonodos inguinais superficiais, a doença propaga-se para os linfonodos femorais (HACKER 2008; CHU et al. 1981; HACKER et al. 1983; PODCZASKI et al. 1990).

Metástases para linfonodos pélvicos são raras, a frequência global é de aproximadamente 9%. Cerca de 20% das pacientes com gânglios inguinais positivos têm linfonodos pélvicos positivos (VAN DER VELDEN e HACKER 1994). Metástases ganglionares pélvicas são raras na ausência de suspeita clínica (N₂) e gânglios na virilha (HACKER 2009). Evidências sugerem que todas as pacientes com três ou mais nódulos pélvicos positivos apresentam um tumor com >4 mm (HACKER 2009).

A disseminação hematogênica geralmente ocorre tardiamente no curso da doença e é rara na ausência de metástase linfonodal. Esta via é incomum em pacientes com um ou dois linfonodos positivos, mas é mais comum em pacientes com três ou mais linfonodos positivos (VAN DER VELDEN e HACKER 1994).

E Tratamento do CEC

Após o trabalho pioneiro de Taussig nos Estados Unidos e Way na Grã-Bretanha, vulvectomy radical e dissecação bilateral dos linfonodos inguinais e pélvicos em bloco foram consideradas o tratamento padrão para a maioria das pacientes com câncer vulvar operável. Embora a taxa de sobrevivência tenha aumentado significativamente com esta conduta agressiva, a morbidade cirúrgica, os distúrbios da função sexual e da imagem corporal levaram a modificações desse plano de tratamento nos últimos 20 anos (HOLSCHNEIDER e BEREK 2008).

As opções de tratamento para o CEC se baseiam no sistema de estadiamento cirúrgico com base em critérios estabelecidos pela FIGO, que incluem variáveis relacionadas à doença primária (estágio inicial ou localmente avançado) e ao acometimento linfonodal (negativo ou positividade ipsilateral ou bilateral) (HOMESLEY et al. 1991).

Para o tratamento de CEC em fase inicial, a excisão radical da lesão com 1 cm de margem livre é considerada adequada (CHAN et al. 2007). Embora a vulvectomy radical tenha sido considerada como o tratamento padrão para a lesão vulvar primária, esta operação está associada a perturbações significativas da imagem corporal e função sexual. DISAIA et al (1979) consideraram o distúrbio psicosssexual como a principal morbidade a longo prazo associados com o tratamento de câncer vulvar. ANDERSEN e HACKER (1983) relataram que, quando comparadas com mulheres adultas saudáveis, a excitação sexual foi reduzida em 8% após se submeterem à vulvectomy.

Para lesões na região anterior da vulva, que envolvem o clitóris ou estão próximos a ele, qualquer tipo de excisão cirúrgica tem consequências psicosssexuais, particularmente em pacientes mais jovens (CHAN et al. 2004). Nestes casos, deve-se considerar o tratamento com radioterapia e biópsia após as sessões para verificação da ausência ou qualquer doença residual (HACKER 2009).

O acometimento linfonodal representa invariavelmente o mais poderoso preditor do resultado (CAVANAGH et al. 1990; HOMESLEY et al. 1991); o risco para metástases linfonodal é insignificante para mulheres com tumores T1 e inferior a 1 mm de invasão estromal, na verdade, nestes casos, evita-se a dissecação linfonodal bilateral inguinofemoral radical, que acarreta morbidade (como linfedema) e a conduta deve, por conseguinte, ser individualizada (HINTEN et al. 2011). A abordagem do linfonodo sentinela é atualmente considerada validada para neoplasias em estágio inicial com diâmetro < 2 cm (OONK et al. 2010a).

Para doença em estágio inicial > 2 cm, a dissecação linfonodal bilateral inguinofemoral radical é recomendada (ROUZIER et al. 2003). O procedimento pode ser realizado em casos em que a lesão esteja localizada lateralmente em grandes lábios ou bilateralmente em casos em que a doença afeta linha média (incluindo pequenos lábios, periclitoral, periuretral ou perianal) (OONK et al. 2010b).

Quando o CEC surge na presença de NIV ou algum distúrbio epitelial não neoplásico, o tratamento é influenciado pela idade da paciente. As pacientes idosas que muitas vezes tinham coceira crônica em longo prazo

geralmente não são perturbadas pela perspectiva de uma vulvectomy radical. Em mulheres mais jovens, é desejável conservar o máximo possível da vulva; assim, a excisão local radical deve ser realizada para a doença invasiva, e a doença associada deve ser tratada da forma mais apropriada (HACKER 2009; BAIOCCHI e ROCHA 2014).

Para o tratamento do carcinoma vulvar localmente avançado com envolvimento vaginal, uretral, ou anal, a quimioirradiação é a opção mais adequada. Neste contexto, o acometimento linfonodal pode preceder o início da radioterapia (DE HULLU e VAN DER ZEE 2006).

O acompanhamento clínico destas pacientes inclui exames para observar o estado nodal na região vulvar e vaginal em período de três a seis meses. A indicação de exames de rotina de imagiologia morfológica ou metabólica deve ser individualizada (LEONARD et al. 2014).

Os CECs são geralmente diagnosticados em um estágio ainda passíveis de tratamentos potencialmente curativos, incluindo cirurgia e / ou radioterapia, com ou sem quimioterapia. No entanto, vários pacientes apresentam doença metastática no momento do diagnóstico, entre aqueles, 30-50% irão apresentar recidiva, e não responderão de maneira eficiente ao tratamento (DE MELO MAIA et al. 2012; SANTEUFEMIA 2012). Recorrências locais ou regionais e metástases à distância têm um papel fundamental na progressão do CEC e o mecanismo subjacente a sua ocorrência ainda é mal-compreendido.

1.2 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA NA PROGRESSÃO DO CÂNCER

O primeiro de muitos passos que levam ao surgimento de um fenótipo invasivo, para a aquisição do local de invasão, envolve as mais importantes trocas no fenótipo de células do câncer dentro do tumor primário. A organização das camadas das células epiteliais em tecidos normais é incompatível com a motilidade e a invasividade, apresentadas por células de carcinoma, ainda que esse plano de organização epitelial continue a ser respeitado em muitos carcinomas primários. Desta forma, com o objetivo de adquirir motilidade e invasividade, as células de carcinoma devem alterar muito o seu fenótipo epitelial e sofrer uma drástica mudança - a transição epitélio-mesênquima (EMT) (WEINBERG 2007).

No processo morfogenético conhecido como EMT, as células perdem suas características epiteliais, ou seja, não se encontram mais organizadas em camadas, onde estavam fortemente aderidas umas às outras por meio do complexo juncional apical, e passam a apresentar o programa transcricional característico de células mesenquimais (BERX et al. 2007), onde as células se associam entre si somente nos contatos focais e não formam uma camada celular organizada, o que permite uma maior motilidade celular (WEINBERG 2007).

A EMT desempenha um papel crucial durante a organogênese (especificamente durante passos da gastrulação em embriogênese inicial),

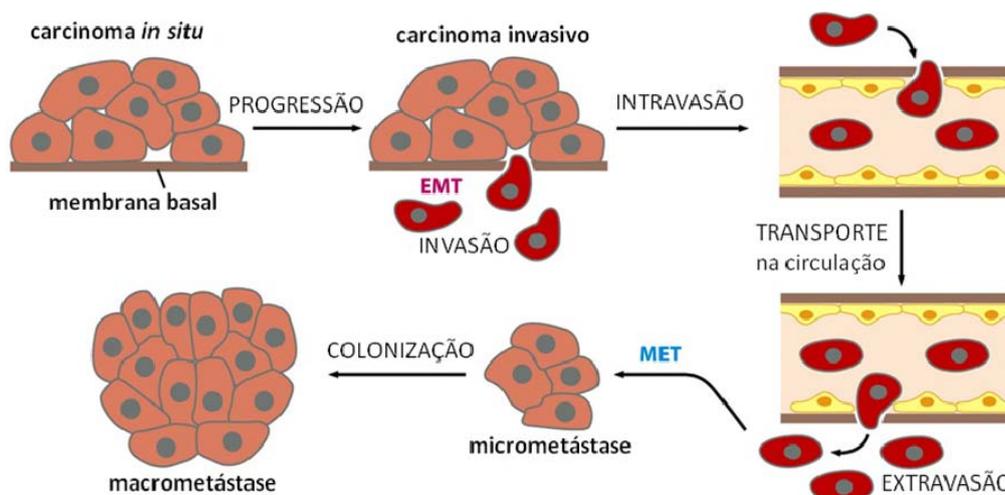
na manutenção da integridade epitelial (como na cicatrização de ferimentos) e no processo de progressão tumoral (SABBAH et al. 2008).

A forte semelhança entre processos patológicos da invasividade do tumor, os passos normais da embriogênese e a manutenção tecidual sugere que o programa complexo exibido por células do carcinoma depende da reativação de programas comportamentais latentes cuja expressão em geral é confinada à embriogênese inicial e a tecidos adultos lesionados. Assim, uma vez que as células do carcinoma reativam o programa de EMT, elas podem explorá-lo para mudar profundamente sua própria morfologia, motilidade e habilidade para invadir camadas de células próximas. Isso implica em múltiplas mudanças no fenótipo celular associadas à invasividade não necessitam ser adquiridas gradativamente pelas células do carcinoma, mas simplesmente a ativação de um programa morfogenético que já está codificado nos seus genomas (WEINBERG 2007).

A execução do programa de EMT envolve, além das alterações na forma e aquisição de motilidade, mudanças fundamentais no perfil de expressão gênica das células. Essas mudanças são influenciadas por fatores de crescimento (TGF- β , EGF), fatores de transcrição (SNAIL, SMAD), moduladores do citoesqueleto (RhoGTPases), proteases extracelulares (metaloproteinases de matriz), moléculas envolvidas na adesão intercelular (caderinas-cateninas) e adesão entre célula e lâmina basal (integrinas) (THORESON et al. 2000). Além disso, extensivas evidências implicam em sinais estromais como elementos-chave na indução

de EMT, porém ainda é mal compreendido como o complexo programa de EMT é coordenado nas células epiteliais (WEINBERG 2007).

De modo importante, a EMT é somente uma troca temporária no fenótipo da célula. Depois que as células em migração se moverem para a posição e cobrirem o sítio da lesão, elas reconstruíram o epitélio pela reversão para o estado epitelial via o programa chamado de transição mesenquimal-epitelial (MET). Essa reversão sugere que EMT com frequência é iniciada por sinais que as células tumorais possuem no ambiente. A reversibilidade de EMT explica uma peculiaridade de muitas metástases. O aspecto frequentemente observado em metástases humanas, em nível histopatológico, é o crescimento secundário se assemelhando ao tumor primário, a massa tumoral apresenta células invasivas que supostamente passaram por EMT com o objetivo de iniciar a disseminação da metástase. É plausível, embora não comprovado, que todos os tipos de carcinoma sofram uma EMT parcial ou completa, para adquirirem capacidade de invadir outros órgãos (DEVITA et al. 2011) e após a formação da metástase passem transientemente pela MET e reverta ao fenótipo de seus ancestrais (WEINBERG 2007) (Figura 5).



Fonte: Adaptada de THIERY (2002).

Figura 5 - Reversibilidade de EMT. Células de câncer epitelial na margem do carcinoma primário sob EMT invadem o estroma e se tornam mesenquimais (células vermelhas). Essa mudança parece iniciada por sinais que essas células recebem do estroma associado ao tumor. O fenótipo mesenquimal permite a tais células invadir localmente, intravasalar e, extravasar para o parênquima de um tecido distante. Uma vez que tenham estabelecido nesse tecido, essas células se encontram em um novo tipo de ambiente estromal, sem os sinais que previamente induziram seus ancestrais a passarem por EMT. Isso permite que elas revertam o fenótipo epitelial via MET.

1.2.1 Sinais do estroma que induzem a EMT

Evidências têm revelado que o envolvimento de certos sinais heterotípicos, originados no estroma reativo de carcinomas primários, afetam as células tumorais localizadas nas margens externas da massa de células epiteliais, e induzem estas células a sofrerem EMT (WEINBERG 2007).

O TGF- β é um potente indutor de EMT, pois pode se associar ao T β R-I ou T β R-II e desencadear uma cascata de sinalização dependente de Smad, para ativar fatores transcricionais, como Lef-1/Tcf, conhecidos por atuar em processos como escape da apoptose e degradação da matriz

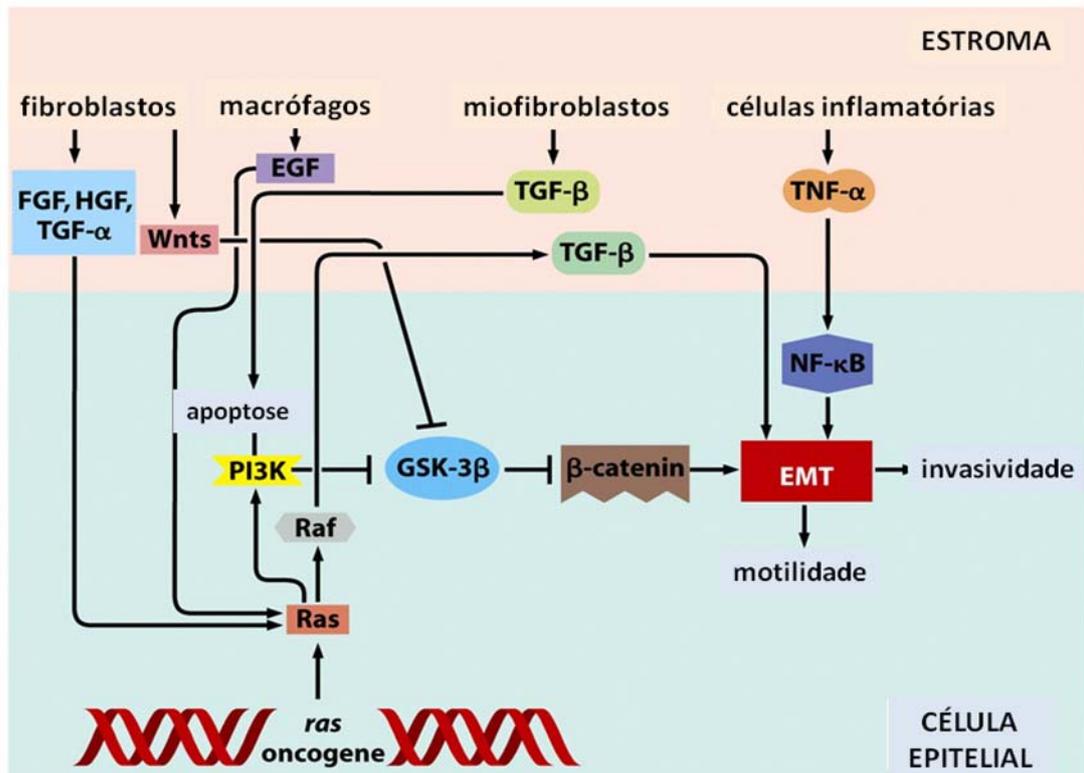
extracelular. Além disso, TGF- β pode atuar numa cascata de sinalização independente de Smad, mimetizando um sinal desencadeado por um receptor tirosinaquinase, que ativa vias de sinalização, como a Ras/MAPK, PI3K, Rho e Rac (MEDICI et al. 2006). Estudos *in vivo* têm demonstrado que a exposição à TGF- β , de células epiteliais mamárias *ras*-transformadas EpRas de camundongos, resultaram na perda progressiva da morfologia epitelial e na redução de marcadores epiteliais, como citoqueratinas e E-caderina. Ao mesmo tempo, essas células transformadas adquiriram marcadores mesenquimais, incluindo vimentina, e se assemelharam morfológicamente à fibroblastos (JANDA et al. 2002).

A ativação da via Ras/MAPK por TGF- β é conhecida por acentuar a expressão de *SNAIL*, um repressor transcricional da E-caderina (MEDICI 2006). Por outro lado, a sinalização pela via WNT também pode induzir a expressão de outro repressor de E-caderina, *SLUG*, representando uma das principais vias relacionadas à EMT (BAUM et al. 2008). Similarmente, a via Src tem participado ativamente deste processo. Recentes estudos vêm mostrando que a proteína Src pode atuar na fosforilação da proteína β -catenina, causando desorganização do complexo E-caderina/catenina, perda da adesão célula-célula e liberação de β -catenina para o citoplasma, podendo atuar na via de sinalização Wnt. A proteína Src atua também na fosforilação de diversas proteínas associadas ao citoesqueleto, como a vinculina, paxilina e cortactina, sugerindo sua participação na migração e invasão celular (GUARINO et al. 2007; BAUM et al. 2008).

TGF- β também ativa a via NF- κ B em células epiteliais. Essa sinalização parece ser crítica para a indução e manutenção da EMT (HUBER et al. 2004).

Outros sinais vêm se revelando como importantes indutores da invasividade das células de carcinomas. A presença de grande número de macrófagos e a produção do fator estimulador de colônias 1 (CSF-1) têm influenciado o comportamento invasivo e metastático das células de carcinoma primário (WYCKOFF et al. 2004; GOSWAMI et al. 2005).

Essas evidências, portanto, sugerem que a aquisição de traços de malignidade por células tumorais, incluindo indução de EMT, não é apenas coordenada pelo genoma dessas células, mas partem de uma colaboração entre alelos mutantes e sinais que estas células recebem de alguns microambientes teciduais (Figura 6). Embora, as identidades precisas desses sinais estromais e seus mecanismos combinatórios de ação ainda não estejam elucidados.



Fonte: WEINBERG (2007).

Figura 6 - Sinais que iniciam a EMT. Esse diagrama representa a visão dos canais de sinalização originados do estroma, que influenciam as células a passarem por EMT parcial ou completa.

1.2.2 A EMT associada à perda de marcadores epiteliais e à aquisição de marcadores mesenquimais

Durante a ativação do processo de EMT, a perda de adesão célula-célula é principalmente dirigida pela E-caderina, marcador de célula epitelial, que frequentemente se encontra menos expressa ou realocada em células derivadas de carcinomas. Essa molécula atua como a principal reguladora da EMT, sendo modulada por diversas vias de sinalização, como aquelas desencadeadas pelos receptores de TGF-β (TβR), a via Wnt e a via Src (BAUM et al. 2008; WELLS et al. 2008).

As caderinas formam uma superfamília de glicoproteínas responsáveis pela adesão intercelular cálcio-dependente, que interagem de maneira homofílica célula-célula. Apresentam uma região extracelular, uma região transmembrana e uma região citoplasmática ou intracelular. Estruturalmente, a região extracelular forma dímeros laterais na superfície celular que interagem com dímeros da célula oposta. No domínio citoplasmático, as caderinas ligam-se as proteínas denominadas cateninas (RIEGER-CHRIST et al. 2001).

O papel essencial de E-caderina na aquisição de fenótipos celulares malignos é sustentado por observações indicando que o gene *CDH1*, que codifica esta proteína, é reprimido por metilação no promotor em muitos tipos de carcinoma humanos invasivos e, em outros casos por certos repressores transcricionais, alterando a fase de leitura. Agentes desmetilantes vêm sendo usados para confirmar a associação desse evento com o processo de aumento do potencial maligno. Por exemplo, a utilização do 5-aza-2-deoxicitidina (5AzaC) provocou um aumento da agregação celular, diminuição da motilidade e supressão de metástase em células de câncer de mama (VAN ROY e BERX 2008). Corroborando com esses dados, LIU et al (2008) demonstraram que a deacetilação da lisina 9 da histona H3 levava a diminuição da expressão da E-caderina em câncer colorretal.

A diminuição da expressão da E-caderina pode amplificar também a resposta da via canônica Wnt, que está envolvida com a estabilização do *pool* citoplasmático de β -catenina. Desta forma, a β -catenina pode se

translocar para o núcleo, podendo ativar fatores transcricionais da família Tcf, induzindo diversos eventos relacionados ao processo tumorigênico, tais como aumento da proliferação celular, escape da apoptose e aumento do potencial invasivo (FUCHS et al. 2005; JEANES et al. 2008) (Figura 7).

Na progressão de alguns carcinomas também pode ser observada a clivagem do domínio extracelular da E-caderina, resultando na E-caderina solúvel (sE-cad) e na liberação do domínio intracelular para o citoplasma. Algumas metaloproteases, tais como MMP-3, -7 e -9, têm sido descritas atuando nesse processo de clivagem. Subsequentemente, a sE-cad pode atuar de maneira parácrina, se associando ao domínio extracelular da E-caderina de células adjacentes e levando à uma desorganização da junção aderente. Já o domínio intracelular, pode ser translocado para o núcleo e ativar genes relacionados com o processo tumorigênico, como ciclina *D1*, *AP-1* e *STAT1/STAT2* (Il et al. 2006; SALAHSHO et al. 2007; SYMOWICZ et al. 2007). No câncer colorretal, a redução da expressão da E-caderina indica um mau prognóstico, sendo correlacionada com o aumento da invasividade tumoral, desenvolvimento de sítios metastáticos e uma menor taxa de sobrevida (KWAK et al. 2007). Semelhantemente, ocorre em carcinomas vulvares, onde a expressão anormal de E-caderina está relacionada com o alto grau patológico e presença metástase linfonodal (ZANNONI et al. 2011; JIA et al. 2013).

A molécula β -catenina é outra proteína que exerce papel importante na junção célula-célula. Essa proteína é responsável pela estabilização do complexo caderina-catenina e a sua perda está relacionada a eventos de

EMT. Normalmente, essa proteína se apresenta em três estados. Ela pode estar ligada ao domínio citoplasmático de receptores de adesão célula-célula, como E-caderina. Alternativamente, de forma totalmente desvinculada, ela existe em um reservatório solúvel no citosol, onde recicla rapidamente. E, finalmente, pode operar no núcleo como um importante componente de fatores de transcrição (WEINBERG 2007), dependente da ativação da via de sinalização Wnt/Wingless, a qual ativa também os fatores de transcrição LEF/Tcf, que, por sua vez, ligados à β -catenina controlam a transcrição de genes, como ciclina *D1*, *MYC* e *MMPs*, podendo levar a proliferação celular e inibição de apoptose (BEHRENS 1999) (Figura 7).

Não está claro, se os dois reservatórios de moléculas de β -catenina, aqueles que contribuem para a formação de junções aderentes e aqueles envolvidos na regulação da transcrição, estão em equilíbrio um com o outro ou se estão totalmente segregados em dois compartimentos em desequilíbrio na célula. Portanto, em células que perderam E-caderina, pode-se esperar que β -catenina seja liberada e, assim, torne-se disponível para a translocação nuclear e ativação transcricional, entretanto, em alguns carcinomas que apresentam mutações em E-caderina, a sinalização nuclear de β -catenina não parece estar acima dos níveis normais (DEVEREUX et al. 1999). Em muitos carcinomas, incluindo mama, próstata, fígado, cólon, endométrio e ovário mutações no gene que codifica β -catenina (*CTNNB1*) têm produzido uma proteína que não pode ser mais fosforilada por GSK-3 β e, como consequência passa a acumular-se no núcleo (WEINBERG 2007) (Figura 7).

Células epiteliais que sofreram EMT frequentemente começam a produzir fibronectina, uma proteína da matriz extracelular que é normalmente secretada apenas nas células mesenquimais, como os fibroblastos, N-caderina, que é adquirida no lugar de E-caderina, formando pontes intermoleculares mais frágeis do que aquelas formadas por homodímeros de E-caderina, e por fim, Vimentina, um componente filamentososo intermediário do citoesqueleto de células mesenquimais (WEINBERG 2007) (Figura 7).

Experimentos *in vitro* têm demonstrado que a expressão ectópica de N-caderina, uma proteína que aumenta a afinidade das células epiteliais com células do estrom, induz a aquisição de motilidade e invasividade, como indicado pela habilidade em romper matriz extracelular reconstruída e introduzida na placa de cultura (HAASS et al. 2004). Resultados semelhantes também têm correlacionado a expressão de Vimentina com a presença de tumores com alto grau patológico e características mais agressivas, incluindo metástase linfonodal em carcinomas de cabeça e pescoço (DE ARAUJO et al. 1993).

A desorganização do complexo E-caderina/catenina e a aquisição de marcadores mesenquimais têm sido associadas a eventos que desencadeiam o processo tumorigênico. Dessa forma, sua correta regulação atua de maneira crucial para modular processos fisiológicos variados, tais como apoptose, proliferação e motilidade celular.

1.2.3 EMT é programada por fatores de transcrição: TWIST, SNAIL1 E SNAIL2(SLUG)

Genes primariamente descritos como importantes no controle da embriogênese, como o *TWIST-1*, *SNAIL-1* e *SNAIL-2 (SLUG)* têm sido descritos como fatores de prognóstico e progressão de algumas neoplasias. A ativação destes fatores de transcrição leva à indução de alterações fenotípicas tornando as células caracteristicamente células tronco (MOODY et al. 2005).

SNAIL e *SLUG* são membros dos fatores de transcrição do tipo dedo de zinco C2H2. Esses fatores parecem operar bastante como repressores de transcrição. Ambos foram descobertos por serem hábeis em reprimir a transcrição do gene *CDH1*, codificador da proteína E-caderina. A perda de expressão de E-caderina leva a mudanças fenotípicas associadas à EMT (WEINBERG 2007) (Figura 7).

Estudos têm evidenciado uma associação entre o aumento de expressão de Snail1 e Slug e pior prognóstico em tumores de mama, ovário, pulmão e carcinoma epidermóide de esôfago (MARTIN et al. 2005; SHIH et al. 2005; UCHIKADO et al. 2005). O aumento da expressão destes fatores de transcrição tem sido correlacionado com metástase linfonodal e diminuição da sobrevida livre de doença em muitos tumores (MOODY et al. 2005). KOJC et al. (2009) demonstraram que o aumento de expressão de SNAIL, SLUG e TWIST, tanto dos níveis de mRNA quanto protéico, presumivelmente leva a eventos de EMT, resultando na progressão tumoral e metástase (YUEN et al. 2007). Além disso, a expressão de SNAIL foi

encontrada em células de carcinoma do ducto mamário humano que não expressam E-caderina. Altos níveis de expressão de TWIST são encontrados em carcinomas lobulares mamários invasivos e, em uma extensão menor, em células de carcinoma invasivas do ducto (YANG et al. 2004). Similarmente, a proteína TWIST é expressa, preferencialmente, em um subtipo “difuso” de carcinoma gástrico e, em menor extensão, no subtipo “intestinal” de carcinomas gástricos (ROSIVATZ et al. 2002).

Ambos, TWIST e SLUG, capacitam as células a resistirem a apoptose e *anoikis* e protegem células em metástase de alguns estresses fisiológicos que poderiam normalmente causar a morte antes de chegarem a tecidos distantes e formarem micrometástases (WEINBERG 2007).

A descoberta de fatores de transcrição que induzem à EMT sugere que a formação de muitos fenótipos malignos pode surgir por mudanças não genéticas, como sinais heterotípicos de origem estromal. Além disso, o alto número de características associadas à malignidade poderia também ser adquirido concomitantemente porque os fatores de transcrição, uma vez expressos, agem de modo pleiotrópico (WEINBERG 2007).

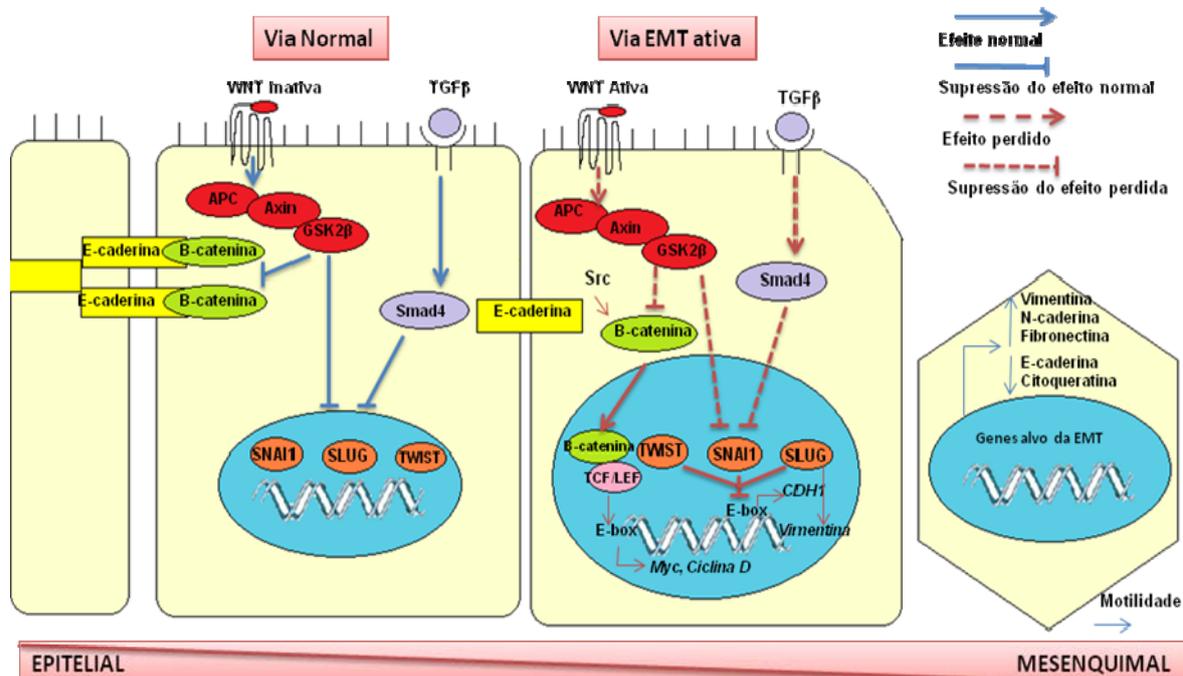
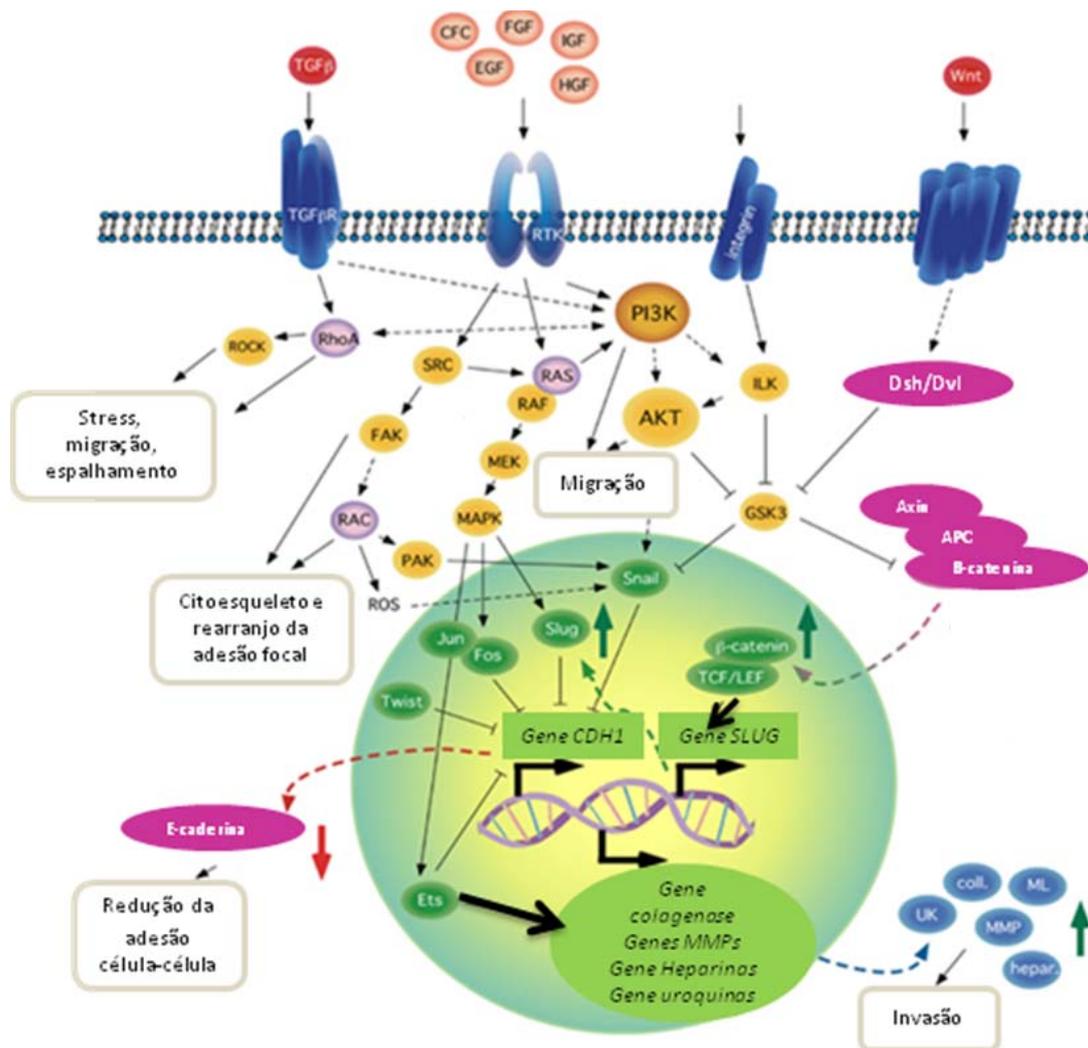


Figura 7 - Processo de EMT e suas mudanças moleculares. Esse quadro representa uma visão bastante simplificada dos canais de sinalização que influenciam células epiteliais a passarem por uma EMT. É provável que EMT seja normalmente disparada em resposta a uma mistura de sinais que as células tumorais receberam no estroma junto com sinais intracelulares, como os liberados pelos fatores de transcrição.

1.3 EVENTOS DE EMT NO TRATAMENTO DO CÂNCER

As evidências acumuladas nos últimos anos indicam que a EMT é um processo crítico não só no desenvolvimento, mas também na tumorigênese. Por sua associação com a invasão e os primeiros passos da metástase, a inibição da EMT aparece como uma estratégia viável para novas abordagens da terapia de câncer. No entanto, devido ao complexo circuito de vias de sinalização ativas neste processo, como a via PI3K/mTOR, ativa em muitos tumores (Figura 8), é provável que a implantação efetiva da terapêutica anti EMT não seja muito simples.



Fonte: Adaptado de LARUE e BELLACOSA (2005).

Figura 8 - Esquema das vias de transdução de sinal associadas com a EMT. Os desfechos finais do processo de EMT estão representados nos retângulos. RTK: receptor tirosina-quinase.

Dados recentes também demonstram que o processo de EMT parece desempenhar um papel na resistência a drogas (IWATSUKI et al. 2009; ZLOBEC e LUGLI 2010). Assinaturas gênicas do processo de EMT têm sido correlacionadas com a presença de resistência a drogas em modelos de carcinoma de mama, ovário, pulmão e bexiga (MCCONKEY et al. 2009; CHANG et al. 2010; HELLEMAN et al. 2010; ISERI et al. 2011). Dados

adicionais sugerem que a EMT contribui direta ou indiretamente para a aquisição deste evento, por alterar a expressão de genes-chave, envolvidos na regulação do ciclo celular, transporte de drogas e apoptose (Figura 8) (WU e BONAVIDA 2009; SAXENA et al. 2011).

Recentemente, dados revelam a participação do processo de EMT na resistência em terapias à base de platina (MOUSTAKAS e HELDIN 2007). Em linhagens de câncer de ovário, uma regulação positiva de SNAIL e SLUG foi correlacionada com a resistência à radiação e paclitaxel (KURREY et al. 2009). ZHANG et al. (2014) demonstraram que o desenvolvimento de resistência à cisplatina, em modelos *in vitro* de carcinomas de nasofaringe, estava acompanhado por eventos de EMT e aumento de metástase em modelos *in vivo*. Adicionalmente, HARA et al. (2014) mostraram que a expressão de E-caderina, foi significativamente menor nos tumores residuais comparados com tumores que não receberam tratamento, sendo correlacionada inversamente com a expressão de SNAIL. Desta forma, a redução da expressão de E-caderina e o aumento da expressão de Snail em tumores residuais de pacientes que receberam quimioterapia foi significativamente correlacionada com pobre resposta à quimioterapia e menor tempo de sobrevida (HARA et al. 2014). Assim, elucidar a associação entre resistência a drogas e EMT pode facilitar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de tumores quimiorresistentes e metastáticos, principalmente pela ativação de vias importantes para manutenção das células tumorais, como a via PI3K/mTOR, ativada na

maioria dos tumores, entretanto, em carcinomas de vulva ainda não está claro seu papel.

1.3.1 A via de transdução de sinal PI3K: novos alvos terapêuticos

A via PI3K/AKT/mTOR é um alvo terapêutico validado em vários tumores. Recentes estudos têm mostrado que a via fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K) pode desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência a terapias, uma vez que a superativação desta via tem sido demonstrada em mais de 60% dos tumores. Além disso, a sua inibição também poderia ser um mecanismo de sensibilização de células tumorais por facilitar a ativação da maquinaria apoptótica, sendo um possível alvo na terapia contra o câncer (HILL e HEMMINGS 2002).

A enzima fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K) é uma quinase de lipídeo altamente conservada que fosforila o grupamento 3'-hidroxila do anel inositol dos fosfoinosítídeos. Esta reação tem início em resposta a fatores de crescimento, como EGF (*epidermal growth factor*), ou hormônios peptídicos, por exemplo, a insulina, ou ainda componentes da matriz extracelular (FEIG 1993; MORGENSZTERN e MCLEOD 2005). Essas moléculas recrutam proteínas que apresentam domínio homólogo à pleckstrin (PH), para a membrana plasmática, como as serina/treonina quinase Akt e PDK-1 (quinase fosfatidilinositol dependente 1) (FRESNO et al. 2004). Por meio desta reação várias vias de sinalização intracelulares são ativadas, dentre elas a via mTOR (*mammalian target rapamycin*) e fatores de transcrição, como Slug, que regulam funções celulares diversas, tais como metabolismo,

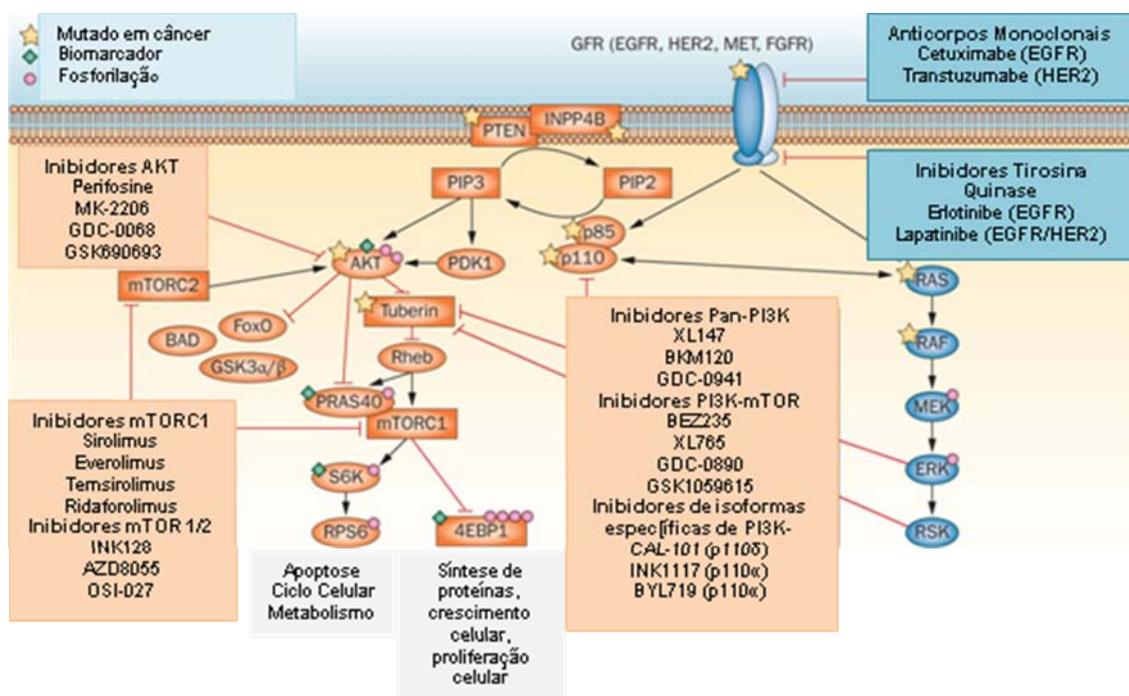
proliferação, diferenciação e estímulos anti-apoptóticos, bem como o tráfego de vesículas intracelulares (ORCY et al. 2008).

Os membros da família da PI3K são agrupados em três classes (I, II ou III), de acordo com sua estrutura e substratos específicos (ENGELMAN et al. 2006). Os representantes mais bem estudados desta família são os membros da classe I, por constituírem uma das principais vias de transdução de sinal ativadas por receptores de membrana (HAWKINS et al. 2006). Esta classe é dividida em subclasses IA e IB baseada na subunidade reguladora. Compreendendo a classe IA estão os heterodímeros compostos de uma subunidade reguladora p85 e uma subunidade catalítica p110, que é composta por quatro isoformas, α , β , γ e δ (HENNESSY et al. 2005; VANHAESEBROCK e ALESSI 2000). O desenvolvimento de inibidores específicos destas isoformas tem atraído atenção entre pesquisadores e companhias farmacêuticas, aguardando o surgimento de novas drogas candidatas especificamente para o tratamento do câncer com mínimos efeitos colaterais (KONG e YAMORU 2007).

Três categorias principais de inibidores de PI3K têm sido desenvolvidas: os agentes que visam PI3K/mTOR (inibidores duais), inibidores pan-PI3K, que englobam todas as isoformas da classe I, e os inibidores de isoformas específicas que têm como alvo seletivamente as isoformas α , β , γ ou δ (JABBOUR et al. 2014) (Figura 9). Diversos desses inibidores foram reportados, demonstrando efeitos anticâncer *in vivo*, como os inibidores de primeira geração LY294002 (VLAHOS et al. 1994) e wortmanina (OKADA et al. 1994) e no entanto, falharam na triagem clínica

por causarem toxicidade à derme e fígado, respectivamente (HU 2000; IHLE et al. 2005).

Diante disso, novos inibidores específicos têm sido desenvolvidos, como NVP-BEZ235, SF1126 e ZSTK474 que têm demonstrado serem drogas promissoras no tratamento do câncer (KONG e YAMORU 2009; LIU et al. 2009).

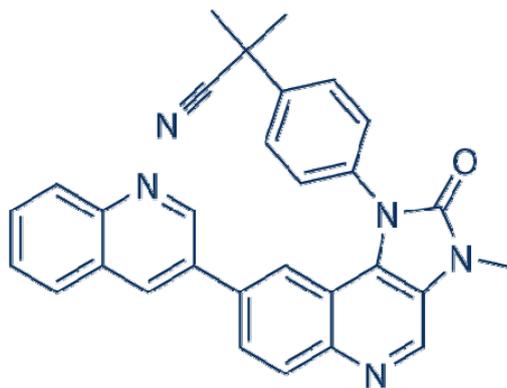


Fonte: Adaptado de RONDON et al. (2013).

Figura 9 - Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e drogas relevantes que têm como alvo cada um dos componentes da via. Numerosos compostos têm sido desenvolvidos para inibir diferentes passos da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. Estes incluem inibidores de PI3K (que, com base na sua seletividade, podem ser subdivididos em inibidores pan - PI3K, inibidores duais de mTOR /PI3K e inibidores de isoformas específicas), inibidores de mTOR (que podem ser divididos em inibidores alostéricos e inibidores catalíticos) e inibidores de AKT (incluindo ambos os inibidores alostéricos e inibidores catalíticos).

1.3.2 NVP-BEZ235

BEZ235 ou NVP-BEZ235 (Figura 10) é um composto derivado da família imidazoquinolina (LIU et al. 2009), desenvolvido pela Novartis Pharmaceuticals®, que inibe a atividade do complexo mTORC1 e mTORC2 e das isoformas mutantes da subunidade p110 α , pela competição pelo sítio de ATP nestas enzimas (EICHHORN et al. 2008; ENGELMAN et al. 2008; MAIRA et al. 2008; BRACHMANN et al. 2009; CHIARINI et al. 2010; ROCCARO et al. 2010). Atualmente está em fase 1/2 de modelos clínicos em tumores sólidos avançados (carcinoma colorretal, mama, pulmão, renal, sarcoma) (GARCIA-ECHEVERRIA e SELLERS 2008).



Fonte: MAIRA et al. (2008).

Figura 10 - Estrutura química do composto NVP-BEZ235.

Estudos prévios têm demonstrado que NVP-BEZ235 desempenha um efeito fortemente inibidor na via PI3K por perda de função do gene *PTEN* ou pela ativação de mutações em *PI3K*, que em alguns tumores levam a resistência à terapia com lapatinibe (EICHHORN et al. 2008). Em modelos

de sarcoma, a droga efetivamente inibiu a metástase para o fígado (MANARA et al. 2010; NANNI et al. 2010). A exposição ao composto NVP-BEZ235 também promoveu diminuição da população de células progenitoras e a capacidade de formar esferas no câncer de próstata em modelos *in vitro* de carcinoma de próstata (DUBROVSKA et al. 2009). Além disso, NVP-BEZ235 apresentou um efeito antitumoral em terapias combinadas com agentes quimioterápicos e radiação ionizante (FABER et al. 2009; MCMILLIN et al. 2009). Adicionalmente, Lin et al (2014) demonstraram que esse composto previne o processo de EMT em modelos *in vitro*, além disso, promovem a supressão do crescimento tumoral.

Devido a estes resultados NVP-BEZ235 poderia ser promissor no tratamento efetivo de tumores que apresentam a via PI3K/Akt/mTOR ativa, uma vez que esse composto atenua efetivamente a atividade dessa via, que é uma das responsáveis pela ativação do processo EMT, e, desta forma, poderia diminuir a invasão e os primeiros passos de metástase no carcinoma de vulva, especialmente, aqueles diagnosticados mais tardiamente.

OBJETIVOS

*“O que é necessário não é a vontade de acreditar,
mas o desejo de descobrir”*

Bertrand Russell

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de transição epitélio-mesenquimal e sua associação com a presença de infecção por tipos específicos de HPV para a determinação de valores prognósticos e preditivos em carcinoma de vulva e também observar o efeito causado neste processo após tratamento com inibidores da via PI3k/mTOR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Identificar alterações de expressão proteica em marcadores de EMT, como Vimentina, E-caderina, β -catenina, Slug, Snail, e Twist2, através de imuno-histoquímica.
- 2 Identificar e tipar HPV em carcinomas de vulva através do Linear Array HPV Genotyping Test – Roche.
- 3 Correlacionar presença de HPV e marcadores de EMT com fatores prognósticos e clínicos em carcinoma de vulva.
- 4 Observar o efeito causado de NVP-BEZ235 nos processos invasivos de linhagem vulvar.
- 5 Verificar a expressão das proteínas envolvidas na via PI3K/mTOR e no evento de EMT após o tratamento com NVP-BEZ235.

ARTIGOS

*“Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado”*

Isaac Newton

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV

Trabalho publicado na Revista:

British Journal of Cancer - Nature

Fator de impacto: 5.082

ISSN 0007-0920 – Cancer Research, UK.

3.2 Artigo 2

**A dual PI3K/mTOR inhibitor as potential therapeutic option for
vulvar cancer**

Este trabalho será submetido na revista:

Molecular Cancer Therapy

Fator de impacto: 5.599

ISSN 1538-8514– American Association for Cancer Research, Inc.

(AACR)

A DUAL PI3K/MTOR INHIBITOR AS POTENTIAL THERAPEUTIC OPTION FOR VULVAR CANCER

Iara S Rodrigues¹, Bruna Roz Rodrigues¹, José Roberto Ferreira¹, Fernanda Giudice¹, Fernanda Carvalho¹, Fábio Marchi¹, Glauco Baiocchi², Vilma Martins¹, Fernando Augusto Soares³, Rafael Malagoli Rocha¹

¹*International Research Center, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil;*

²*Department of Gynecology Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil*

³*Department of Anatomic Pathology, A. C. Cancer Center, São Paulo, Brazil*

***Corresponding author:**

Rafael Malagoli Rocha. International Research Center, A. C. Camargo Cancer Center: Rua Taguá, 440. 1º Andar – Patologia Investigativa, 015080-10, Liberdade - São Paulo, Brazil.

email: rafael.malagoli@gmail.com. Phone number: (+55)(11) 2189-5000

extension: 2960, Fax: (+55)(11) 3272-0495

CONCLUSÃO

*“Deus nos fez perfeitos e não escolhidos capacitados,
capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende
de nossa vontade e perseverança”*

Albert Einstein

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- Alterações nos níveis de expressão de E-caderina, β -catenina, Slug, Snail, Twist2 e Vimentina estavam induzindo a aquisição de um comportamento migratório e invasivo em carcinoma de vulva.
- A importância de avaliar a expressão dessas proteínas em diferentes subpopulações morfológicas de células tumorais, tumor central e frente de invasão, a fim de determinar se essas alterações estariam induzindo a aquisição de um comportamento migratório e invasivo.
- β -catenina representa um importante biomarcador para estabelecer prognóstico.
- Baixa expressão β -catenina associada com alta expressão de Slug caracteriza um subgrupo de tumor com pior sobrevida e aumento de invasão e progressão.
- Positividade para HPV está associada com melhor sobrevida de pacientes com carcinoma de vulva.
- Tumores positivos para HPV não apresentam eventos de EMT.
- NVP-BEZ235 atenua a atividade da via PI3K/mTOR.
- NVP-BEZ235 inibe invasão, migração e proliferação em carcinoma de vulva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. Tecidos e cancer; p.697-740.

Alos L Moyano S Nadal A, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome, **Cancer** 2009 115:2701-9.

[ACS] American Cancer Society. **Vulva cancer**. Available from: <URL:http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp.2013> [2014 mai 12].

Andersen BL, Hacker NF, Psychological adjustment after vulvar surgery. **Obstet Gynecol** 1983; 62:457-61.

Ansink AC, Krul MR, De Weger RA, et al. Human papillomavirus lichen sclerosus and squamous cell carcinoma of the vulva: detection and prognostic significance. **Gynecol Oncol** 1994; 52:180-4.

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

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomavirus: analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophys J** 1991; 60:1445-56.

Baum B, Stettelman J, Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. **Semin Cell Dev Biol** 2008; 19:2094-308.

Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:15-30.

Berek J, Ferrari R. Câncer de Vulva. In: Halbe HW, editor. **Tratado de ginecologia**. São Paulo: Roca; 1989. p.154-60.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification restriction fragment length polymorphisms nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis** 1994; 170:1077-85.

Berx G, Raspé E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. **Clin Exp Metastasis** 2007; 24:587-97.

Bloss JD, Liao SY, Wilczynski SP, et al. Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. **Hum Pathol** 1991; 22:711-8.

Booy FP, Roden RB, Greenstone HL, Schiller JT, Trus BL. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. **J Mol Biol** 1998; 281:95-106.

Brachmann SM, Hofmann I, Schnell C, et al. Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:22299-304.

Buxant F, Anaf V, Haouari H. Rapid Groin Recurrence of a vulvar carcinoma with invasion of the femoral vessels and the importance of the initial groin dissection in the staging surgery. **Acta Chir Belg** 2005; 105:418-9.

Cavanagh D, Fiorica JV, Hoffman MS, et al. Invasive carcinoma of the vulva, Changing trends in surgical management. **Am J Obstet Gynecol** 1990; 163:1007-15.

Chan JK, Sugiyama V, Tajalli TR, et al. Conservative clitoral preservation surgery in the treatment of vulvar squamous cell carcinoma. **Gynecol Oncol** 2004; 95:152-6.

Chan JK, Sugiyama V, Pham H, et al. Margin distance and other clinico-pathologic prognostic factors in vulvar carcinoma: a multivariate analysis. **Gynecol Oncol** 2007; 104:636-41.

Chang TH, Tsai MF, Su KY, et al. Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. **Am J Respir Crit Care Med** 2010; 183:1071-9.

Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res** 2010; 70:8097-107.

Christofori G. New signals from the invasive front. **Nature** 2006; 441:444-50.

Chu J, Tamimi HK, Figue DC. Femoral node metastases with negative superficial inguinal nodes in early vulvar cancer. **Am J Obstet Gynecol** 1981; 140:337-41.

Conforti NDT. Suscetibilidade genética ao câncer. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.295-305.

Creasman WT, Huh WK. **Malignant vulvar lesions**. Available from: <URL:<http://emedicine.medscape.com/article/264898-overview>> [2011 mai 17]

Crum CP. Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. **Obstet Gynecol** 1992; 79:448-54.

Crum CP, Granter SR. Squamous neoplasia of the vulva. In: Crum CP, Lee KR, editor. **Diagnostic obstetric and gynecologic pathology**. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p.230-55.

de Araujo VC, Pinto DS Jr, de Sousa SO, et al. Vimentin in oral squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 1993; 250:105-9.

de Hullu JA, van der Zee AG. Surgery and radiotherapy in vulvar cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2006; 60:38-58.

de Koning MN, Quint WG, Pirog EC. Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. **Mod Pathol** 2008; 21:334-44.

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.

de Melo Maia B, Munhoz Cestari F, Lavorato-Rocha AM, et al. Characterization of sociodemographic and clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma. **Gynecol Obstet Invest** 2013; 75:53-60.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virology** 2004; 324:17-27.

Devereux TR, Anna CH, Foley JF, White CM, Sills RC, Barrett JC. Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis. **Oncogene** 1999; 18:4726-33.

DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. **Cancer principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins a Wolters Kluwer; 2011. Invasion and metastasis; p.10.143-61.

Disaia PJ, Creasman WT, Rich WM. An alternative approach to early cancer of the vulva. **Am J Obstet Gynecol** 1979; 133:825-31.

Doorbar J, Sterling JC. The biology of human papillomaviruses. In: Sterling JC, Tying SK, editors. **Human papillomaviruses: clinical and scientific advances**. Londres: Arnold; 2001; p.10-23.

Doorbar J, Parton A, Hartley K, et al. Detection of novel splicing patterns in a HPV 16-containing keratinocyte cell line. **Virology** 1990; 178:254-62.

Dubrovskaja A, Kim S, Salamone RJ, et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:268-73.

Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. **Cancer Res** 2008; 68:9221-30.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet** 2006; 7:606-19.

Engelman JA, Chen L, Tan X, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. **Nat Med** 2008; 14:1351-6.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **J Virol** 1997; 71:149-56.

Faria JL. **Patologia especial com aplicação clínicas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. Patogênese das doenças; p.210-30.

Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR, Cancer and genomics. **Nature** 2001; 409:850-2.

Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. **Oncogene** 2008; 27:5511–26.

Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. **Cancer Res** 2005; 65:5278-83.

Faber AC, Li D, Song Y, et al. Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:19503-8.

Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with humanpapillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:261-9.

Feig LA. The many roads that lead to ras. **Science**1993; 260:767-8.

Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the reproductive stage of the viral cycle. **J Virol** 2000; 15:6622-31.

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev** 2004; 30:193-204.

Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, Minamoto T. Oncogenic β -catenin signaling networks in colorectal cancer. **Cell Cycle** 2005; 4:1522-39.

Gordinier ME, Malpica A, Burke TW, et al. Groin recurrence in patients with vulvar cancer with negative nodes on superficial inguinal lymphadenectomy. **Gynecol Oncol** 2003; 90:625-8.

Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. **Pathology** 2007; 39:305-18.

Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J Mol Histol** 2004; 35:309-18.

Hacker NF, Nieberg RK, Berek JS, et al. Superficially invasive vulvar cancer with nodal metastasis. **Gynecol Oncol** 1983; 15:65-77.

Hacker NF. Vulvar cancer. In: Hacker NF Moore JG, editors. **Essentials of obstetrics and gynecology**. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p.536-75.

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.

Hampf M, Sarajuuri H, Wentzensen N, et al. Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar vaginal and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. **Obstet Gynecol** 2006; 108:1361-8.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hara J, Miyata H, Yamasaki M, et al. Mesenchymal phenotype after chemotherapy is associated with chemoresistance and poor clinical outcome in esophageal cancer. **Oncol Rep** 2014; 31:589-96.

Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. Signalling through class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem Soc Trans** 2006; 34:647-62.

Helleman J, Smid M, Jansen MP, et al. Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture. **Gynecol Oncol** 2010; 117:170-6.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** 2005; 4:988-1004.

Hillemanns P, Wang X. Integration of HPV-16 and HPV-18 DNA in vulvar intraepithelial neoplasia. **Gynecol Oncol** 2006; 100:276-82.

Hill MM, Hemmings BA. Inhibition of protein kinase B/Akt implications for cancer therapy. **Pharm Therap** 2002; 93:243-51.

Hinten F, van den Einden LCG, Hendriks JCM et al. Risk factors for short-term and long-term complications after groin surgery in vulvar cancer. **Br J Cancer** 2011; 105:1279-87.

Holschneider CH, Berek JS. Câncer vulvar. In: Berek JS, editor. **Berek & Novak: tratado de ginecologia**. 14^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008. p.1136-59.

Homesley HD, Bundy BN, Sedlis A, et al. Assessment of current international federation of gynecology and obstetrics staging of vulvar carcinoma relative to prognostic factors for survival (a Gynecologic Oncology Group study). **Am J Obstet Gynecol** 1991; 164:997-1004.

Hording U, Junge J, Daugaard S, et al. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. **Gynecol Oncol** 1994; 52:241-6.

Hu L, Zaloudek C, Mills GB, et al. In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). **Clin Cancer Res** 2000; 6:800-6.

Huber MA, Azoitei N, Baumann B, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. **J Clin Invest** 2004; 114:569-81.

Ihle NT, Paine-Murrieta G, Berggren MI, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor px-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. **Mol Cancer Ther** 2005; 4:1349-57.

li M, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion apoptosis growth and angiogenesis. **Exp Biol Med** 2006; 231:20-7.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **International Association of cancer registries: cancer Incidence in five continents**. Lyon: IARC Scientifics Pu; 1992.

Iseri OD, Kars MD, Arpacı F, et al. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial- mesenchymal transition gene expression pattern. **Biomed Pharmacother** 2011; 65:40-5.

Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, et al. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. **Obstet Gynecol** 1997; 89:81-4.

Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Sci** 2009; 101:293-9.

Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, Hochhaus A. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. **Haematologica** 2014; 99:7-18.

Janda E, Lehmann K, Killisch I, et al. Ras and TGF-beta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. **J Cell Biol** 2002; 156:299-314.

Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene** 2008; 27:6920-9.

Jia L, Ouyang L, Zhou Y, et al. Expression and clinical significance of E-cadherin and β -catenin in the vulvar squamous cell carcinoma tissues. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi** 2013; 48:437-41.

Jones RW, Rowan DM, Stewart AW. Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. **Obstet Gynecol** 2005; 106:1319-26.

Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, et al. p53 protein overexpression is common and independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. **Cancer** 1997; 80:1228-33.

Knopp S, Nesland JM, Tropé C, Holm R. p14ARF a prognostic predictor in HPV-negative vulvar carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2006; 126:266-76.

Knudson AG Jr. Hereditary cancer oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res** 1985; 45:1437-43.

Kojc N, Zidar N, Gale N, et al. Transcription factors Snail Slug Twist and SIP1 in spindle cell carcinoma of the head and neck. **Virchows Arch** 2009; 454:549-55.

Kong D, Yamori T. ZSTK474 is an ATP-competitive inhibitor of class I phosphatidylinositol 3 kinase isoforms. **Cancer Sci** 2007; 98:1638-42.

Kong D, Yamori T. Advances in development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. **Curr Med Chem** 2009; 16:2839-54.

Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH Basaloid and warty carcinomas of vulva: Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently association with human papillomaviruses. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:133-45.

Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, et al. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. **Stem Cells** 2009; 27:2059-68.

Kwak JM, Min BW, Lee JH, et al. The prognostic significance of Ecadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 2007; 50:1873-80.

Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol** 2009; 27:1992-8.

Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. **Oncogene** 2005; 24:7443-54.

Lee YY, Wilczynski SP, Chumakov A, Chih D, Koeffler HP. Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. **Oncogene** 1994; 9:1655-9.

Leonard B, Kridelka F, Delbecq K, et al. A clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Biomed Res Int** 2014; 2014:480573

Lerma E, Matias-Guiu X, Lee SJ, Prat J. Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy HPV p53 and pRb. **Int J Gynecol Pathol** 1999; 18:191-7.

Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. **Int J Cancer** 2003; 106:553-8.

Liu TJ, Koul D, LaFortune T, et al. NVP-BEZ235 a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. **Mol Cancer Ther** 2009; 8:2204-10.

Liu Y, Hong Y, Zhao Y, Ismail TM, Wong Y, Eu KW. Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines. **Cancer Invest** 2008; 26:575-82.

Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235 a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. **Mol Cancer Ther** 2008; 7:1851-63.

Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, et al. NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. **Clin Cancer Res** 2010; 16:530-40.

Martins NV. Vulva. In: Lima GR, Gebrim LH, Oliveira VC, Martins NV, editores. **Ginecologia oncológica**. Porto Alegre: Atheneu; 1999. p.266-82.

Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail slug and twist and their clinical significance in human breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2005; 12:488-96.

McConkey DJ, Choi W, Marquis L, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:335-44.

McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha 6 integrin confers papillomavirus capsid binding upon receptor-negative B-cells. **Virology** 1999; 261:271-9.

McMillin DW, Ooi M, Delmore J, et al. Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. **Cancer Res** 2009; 69:5835-42.

Medici D, Hay ED, Goodenough DA. Cooperation between Snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. **Mol Biol Cell** 2006; 17:1871-9.

Monk BJ, Burger RA, Lin F, et al. Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. **Obstet Gynecol** 1995; 85:709-15.

Moody SE, Perez D, Pan TC, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. **Cancer Cell** 2005; 8:197-209.

Moore DH, Koh WJ, Mcguire WP, et al. Vulva. In: Barakat RR, Markman M, Randall ME, editors. **Principles and practice of gynecologic oncology**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.555-90.

Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. **Anticancer Drugs** 2005; 16:797-803.

Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. **Cancer Sci** 2007; 98:1512-20.

[NCI] National Cancer Institute. **Cancer facts and figures 2005**. Available from: <UR:<http://www.nci.nih.gov/cancertopics/pdq/vulvar>>. [2011 jun 6].

Nanni P, Nicoletti G, Landuzzi L, et al. High metastatic efficiency of human sarcoma cells in Rag2/gammac double knockout mice provides a powerful test system for antimetastatic targeted therapy. **Eur J Cancer** 2010; 46:659-68.

Okada T, Sakuma L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem** 1994; 269:3563-7.

Oonk MHM, van de Nieuwenhof HP, van der Zee AGJ, de Hullu JA. Update on the sentinel lymph node procedure in vulvar cancer. **Expert Rev Anticancer Ther** 2010a; 10:61-9.

Oonk MHM, de Hullu JA, van der Zee AGJ. Current controversies in the management of patients with early-stage vulvar cancer. **Curr Opin Oncol** 2010b; 22:481-6.

Orcy RB, Schroeder S, Martins-Costa SH, et al. Signalization of Akt/PKB in the placenta skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecol Obstet Invest** 2008; 66:231-6.

Oriel JD. Natural history of genital warts. **Br J Venerol Dis** 1971; 47:1-13.

Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva cervix and endometrium. **Int J Gynecol Obst** 2009; 105:103-4.

Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrão F, Villa LL. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables. **Gynecol Oncol** 1999; 74:61-7.

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

Podczaski E, Sexton M, Kaminski P, et al. Recurrent carcinoma of the vulva after conservation treatment for “microinvasive” disease. **Gynecol Oncol** 1990; 39:65-8.

Rieger-Christ KM, Cain JW, Braasch JW, et al. Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. **Hum Pathol** 2001; 32:18-23.

Riethdorf S, Neffen EF, Cviko A, Löning T, Crum CP, Riethdorf L. p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias. **Hum Pathol** 2004; 35:1477-83.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. **Fundamentos de patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008; Câncer de vulva; p.1020-2.

Roccaro AM, Sacco A, Husu EN, et al. Dual targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway as an antitumor strategy in Waldenstrom macroglobulinemia. **Blood** 2010; 115:559-69.

Rondon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. **Nat Rev Clin Oncol** 2013; 10:143-53.

Rohls M, Winkenbach S, Meyer S, Rupp T, Dürst M. Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type 16. **Virology** 1991; 183:331-42.

Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail SIP1 and twist in gastric cancer. **Am J Pathol** 2002; 161:1881-91.

Rouzier R, Haddad B, Dubernard G, Dubois P, Paniel BJ. Inguinofemoral dissection for carcinoma of the vulva: effect of modifications of extent and technique on morbidity and survival. **J Am Coll Surg** 2003; 196:442-50.

Rusk D, Sutton GP, Look KY, Roman A. Analysis of invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vulvar intraepithelial neoplasia for the presence of human papillomavirus DNA. **Obstet Gynecol** 1991; 77:918-22.

Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. **Drug Resist Updat** 2008; 11:123-51.

Salahsho S, Naidoo R, Serra S, et al. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. **Mod Pathol** 2007; 21:271-81.

Santos M, Landolfi S, Olivella A, et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:1347-56.

Santeufemia DA, Capobianco G, Re GL, et al. Cisplatin-gemcitabine as palliative chemotherapy in advanced squamous vulvar carcinoma: report of two case. **Eur J Gynaecol Oncol** 2012 33:421-2.

Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. **Cell Death Dis** 2011 2:e179.

Scurry J, Flowers L, Wistuba I, et al. Human papillomavirus presence and survival. **Int J Gynecol Cancer** 1999; 9:173-4.

Shih leM, Sheu JJ, Santillan A, et al. Amplification of a chromatin remodeling gene Rsf-1/HBXAP in ovarian carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:14004-9.

Shukla S, Bharti AC, Mahata S. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **Indian J Med Res** 2009 130:222-33.

Silva IDCG, Otsuka AY, Viillanova FE, Affonso R, Carvalho CV. Câncer ginecológico. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.203-12.

Skapa P, Zamecnik J, Hamsikova E, et al. Human papillomavirus (HPV) profiles of vulvar lesions: possible implications for the classification of vulvar squamous cell carcinoma precursors and for the efficacy of prophylactic HPV vaccination. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:1834-43.

Souen JS. Câncer da vulva: neoplasia intra-epitelial vulvar. In: Abrão FS, editor. **Tratado de oncologia genital e mamária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. p.483-8.

Stanley M. Prophylactic HPV vaccines: prospects for eliminating ano-genital cancer. **Br J Cancer** 2007; 96:1320-3.

Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Pole of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature** 1998; 393:229-34.

Stroup AM, Harlan LC, Trimble EL, Demographic clinical and treatment trends among women diagnosed with vulvar cancer in the U.S. **Gynecol Oncol** 2008; 108:577-83.

Sutton BC, Allen RA, Moore WE, Dunn ST. Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. **Mod Pathol** 2008; 21:345-54.

Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, et al. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. **Cancer Res** 2007; 67:2030-39.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, **Nat Rev Cancer** 2002; 2:442-54.

Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. **J Cell Biol** 2000; 148:189-202.

Toki T, Kurman RJ, Park JS, Kessis T, Daniel RW, Shah KV. Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Int J Gynecol Pathol** 1991; 10:107-84.

Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA, Shah KV, Kurman R. Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. **Obstet Gynecol** 1996; 87:59-64.

Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, et al. Slug expression in the e-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1174-80.

Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell Mol Life Sci** 2008 65:3756-88.

Van Der Velden J, Hacker NF. Update on vulvar carcinoma. In: Rothenberg ML, editor. **Gynecologic oncology: controversies and new developments**. Boston: Kluwer; 1994. P.101-19.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J** 2000; 346:561-7.

Vanin K, Scurry J, Thorne H, Yuen K, Ramsay RG. Overexpression of wild-type p53 in lichen sclerosus adjacent to human papillomavirus-negative vulvar cancer. **J Invest Dermatol** 2002; 119:1027-33.

Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. **Adv Cancer Res** 1997; 71:321-41.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). **J Biol Chem** 1994; 269:5241-8.

Wang Z, Tropè C, Suo Z, et al. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. **BMC Cancer** 2008; 8:308.

Weinberg RA. **The biology of cancer**. New York: Garland Science; 2007. Moving out: invasion and metastasis; p.587-619.

Wells A, Yates C, Shepard CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. **Clin Exp Metastasis** 2008; 25:621-28.

Wu K, Bonavida B. The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. **Crit Rev Immunol** 2009; 29:241-54.

Wyckoff J, Wang W, Lin EY, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. **Cancer Res** 2004; 64:7022-9.

Yang J, Mani AS, Donaher JL, et al. Twist a master regulator of morphogenesis plays an essential role in tumor metastasis. **Cell** 2004 117:927-39.

Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA, Nohaile M, Botchan M. The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:5086-90.

Yuen HF, Chan YP, Wong ML, et al. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis, **J Clin Pathol** 2007; 60:510-4.

Zannoni GF, Prisco MG, Vellone VG, et al. Changes in the expression of oestrogen receptors and E-cadherin as molecular markers of progression from normal epithelium to invasive cancer in elderly patients with vulvar squamous cell carcinoma. **Histopathology** 2011; 58:265-75.

Zhang P, Liu H, Xia F, et al. Epithelial-mesenchymal transition is necessary for acquired resistance to cisplatin and increases the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. **Int J Mol Med** 2014; 33:151-9.

Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. **Onco Target** 2010; 1:651-61.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology** 2009; 384:260-5.

ANEXOS

DEMAIS ARTIGOS PUBLICADOS

Além dos artigos anteriormente mencionados, elaborei, executei e colaborei com o desenvolvimento de outros projetos com enfoque em mecanismos moleculares envolvidos na progressão do carcinoma de vulva e sua correlação com características clínico-patológicas. Nestes trabalhos participei como coautora durante o processo de doutoramento e destaco a colaboração do Departamento de Ginecologia do A C Camargo Cancer Center, liderado pelo Dr. Glauco Baiocchi. Os artigos são:

Artigo 3

- Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside. de Melo Maia B1, Lavorato-Rocha AM, **Rodrigues IS**, Baiocchi G, Cestari FM, Stiepcich MM, Chinen LT, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM. *J Transl Med.* 2012; 10:150. **(Anexo 1)**

Artigo 4

- Characterization of sociodemographic and clinicopathological features in brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma. Beatriz de Melo Maia, F Munhoz Cestari, André Mourão Lavorato-Rocha, **Iara Sant'Ana Rodrigues**, Glauco Baiocchi, G Cardoso Guimarães, José Vassallo, Mônica Stiepcich, Fernando Augusto Soares, R Malagoli Rocha. *Gynecologic and obstetric investigation* 2012, 75 (1), 53-60. **(Anexo 2)**

Artigo 5

- Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein. André Mourão Lavorato-Rocha, Beatriz de Melo Maia, **Iara Sant'ana Rodrigues**, Mônica Maria Ágata Stiepcich, Glauco Baiocchi, Flávia Munhoz da Silva Cestari, Kátia Cândido Carvalho, Fernando Augusto Soares, Rafael Malagoli Rocha. *Annals of surgical oncology* 2013, 20:31-39. **(Anexo 3)**

Artigo 6

- Does the count after inguinofemoral lymphadenectomy in vulvar cancer correlate with outcome? G Baiocchi, FM Silva Cestari, RM Rocha, CC Faloppa, LY Kumagai, EM Fukazawa, L Badiglian-Filho, LA Cestari, **I Sant'Ana Rodrigues**, A Lavorato-Rocha, BM Maia, FA Soares. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 2013, 39: 339-343. **(Anexo 4)**

Artigo 7

- Prognostic value of the number and laterality of metastatic inguinal lymph nodes in vulvar cancer: Revisiting the FIGO staging system. G Baiocchi, FM Silva Cestari, RM Rocha, A Lavorato-Rocha, BM Maia, LA Cestari, LY Kumagai, CC Faloppa, EM Fukazawa, L Badiglian-Filho, **I Sant'Ana Rodrigues**, FA Soares. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 2013, 39: 780-785. **(Anexo 5)**

Artigo 8

- Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. AM Lavorato-Rocha, **IS Rodrigues**, B de Melo Maia, MMÁ Stiepcich, Glauco Baiocchi, Kátia Cândido Carvalho, Fernando Augusto Soares, José Vassallo, Rafael Malagoli Rocha. *Tumor Biology* 2013, 34 (6), 3713-3720. **(Anexo 6)**

Artigo 9

- microRNA portraits in human vulvar carcinoma. B de Melo Maia, AM Lavorato-Rocha, **Iara Sant'Ana Rodrigues**, Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, Glauco Baiocchi, Monica Maria Stiepcich, Renato Puga, Leandro de A Lima, Fernando Augusto Soares, Rafael Malagoli Rocha. *Cancer Prevention Research* 2013, 6 (11), 1231-1241. **(Anexo 7)**

Artigo 10

- EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. Beatriz de Melo Maia, Adriana Mazega Fontes, André Mourão Lavorato-Rocha, **Iara Sant'Ana Rodrigues**, Louise de Brot, Glauco Baiocchi, Monica Maria Stiepcich, Fernando Augusto Soares, Rafael Malagoli Rocha. *Human Pathology* 2014, 45(5):917-25. **(Anexo 8)**