

**AVALIAÇÃO DE NOVOS FATORES
PROGNÓSTICOS EM CARCINOMAS
VULVARES ATRAVÉS DA INTEGRAÇÃO DE
DADOS GENÔMICOS E TRANSCRIPTÔMICOS**

ANDRÉ MOURÃO LAVORATO DA ROCHA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

Co-Orientadora: Dra. Yukie Sato-Kuwabara

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rocha, André Mourão Lavorato da

Avaliação de novos fatores prognósticos em carcinomas vulvares através da integração de dados genômicos e transcriptômicos / André Mourão Lavorato da Rocha – São Paulo, 2016.

84p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. NEOPLASIAS VULVARES. 2. PROGNÓSTICO. 3. COMPONENTES GENÔMICOS. 4. TRANSCRIÇÃO GENÉTICA. 5. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR/genética

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um momento ímpar no qual conseguimos registrar em palavras um pouco que seja da participação de todos a nossa volta por termos conseguido alcançar um objetivo por esse motivo acredito que seja desleal atribuir grau de importância a qualquer um que seja e, portanto, peço que leiam o que se segue sem as amarras das linhas e parágrafos, e sim como um grande e uniforme muito obrigado!

A princípio gostaria de agradecer a deus por ter me concedido todas as condições necessárias para a concretização de mais uma importante etapa da minha vida.

Em seguida gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Rafael Malagoli Rocha que nos últimos seis anos participou ativamente e incansavelmente no meu desenvolvimento enquanto pesquisador, sempre me incentivando a buscar mais conhecimento e respostas aos obstáculos inerentes à pesquisa. Além disso, gostaria de agradecer-lhe imensamente pela atenção, compreensão e tempo dispendidos a mim, pois em um período tão longo de convivência a relação de orientador e orientado por vezes foi deixada de lado e encontrei nele um amigo.

À minha co-orientadora Dra. Yukie Sato-Kuwabara gostaria de expressar meus mais profundos agradecimentos por ter me ajudado desde a concepção até a conclusão desse trabalho além de uma pessoa incrível ela sempre foi presente e criteriosa, o que contribuiu inequivocamente com a qualidade final desse estudo.

À minha família o agradecimento transcende o momento atual. o agradecimento a eles vem desde o meu nascimento, por terem me recebido, me criado, educado e guiado, sempre me dando o suporte necessário, porém me deixando livre para que eu fizesse minhas escolhas sem questionamentos. Conquistei o que tenho e me tornei o que sou graças a eles, meus pais fundamentalmente e também meus irmãos. o amor e admiração que sinto por eles é indescritível, portanto o que resta dizer é um

simples muito obrigado carregado com todos os melhores sentimentos possíveis e imagináveis.

Aos meus amigos que fiz em São Paulo e aos que mantenho em belo horizonte o meu muito obrigado. Eles aguentaram minhas angústias, minhas loucuras e minhas ausências, mesmo assim continuaram a ser as pessoas mais maravilhosas que eu poderia ter conquistado nessa vida.

Por fim gostaria de agradecer as pacientes que apesar do difícil momento que enfrentaram ao diagnóstico e tratamento dos seus carcinomas vulvares tiveram a clareza e coragem de acreditarem que a doação de parte da sua carne para a pesquisa poderia auxiliar não diretamente a elas, mas outras mulheres que em algum momento poderiam se beneficiar dos avanços científicos promovidos pela pesquisa.

RESUMO

Rocha AML. **Avaliação de novos fatores prognósticos em carcinomas vulvares através da integração de dados genômicos e transcriptômicos.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma vulvar é uma neoplasia rara, contudo possui elevada mortalidade (~40%) e pouco se conhece a respeito de sua assinatura molecular. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes moduladores dessa neoplasia baseando-se em integração de dados genômicos e transcriptômicos. Para alcançar esse objetivo 17 amostras de carcinomas vulvares que continham DNA e RNA suficientes foram selecionadas para a realização das técnicas de CGH-array e Expressão em larga escala. Os genes obtidos a partir da integração de dados realizada pelo algoritmo CONEXIC foram submetidos a uma avaliação funcional *in silico* nos softwares IPA e KOBAS e dois genes foram selecionados para a validação por meio de qRT-PCR, absoluta e relativa. A expressão proteica desses genes foi avaliada por IHQ em 150 casos. A avaliação integrada dos dados revelou 47 candidatos a moduladores, dos quais 46 foram classificados com concomitante ganho de cópias e aumento da expressão gênica e somente um com perda de cópia associada à diminuição de expressão. A partir das análises os genes *PLXDC2* e *GNB3* foram selecionados, sendo o primeiro o único com perda de cópia e diminuição da expressão. A partir da avaliação das variações de intensidade de coloração IHQ entre os tumores foi possível observar que a alta expressão de *GNB3* concomitante a menor expressão de *PLXDC2* está associada a menor risco de desenvolver metástases linfonodais ($p=0,016$) e tempos maiores de sobrevida livre de doença ($p=0,005$). Sendo assim, é possível sugerir que a avaliação proteica desses genes poderia ser usada para avaliação prognóstica.

SUMMARY

Rocha AML. **[Assessment of new prognostic factors in vulvar carcinomas by integrating genomic and transcriptomic data]**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) is a rare disease that has a high mortality rate (~40%). However, little is known about its molecular signature. Therefore, our aims were to identify driver genes in VSCC, based on comparative genome hybridization (aCGH) and genome-wide expression (GWE) array. To achieve that, DNA and RNA were extracted from 17 frozen VSCC samples and examined by aCGH and GWE array, respectively. Based on the integration of data using the CONEXIC algorithm, *PLXDC2* and *GNB3* were validated by qRT-PCR. The expression of these genes was then analyzed by immunohistochemistry (150 FFPE samples). In our integrative analysis, we identified 47 putative drivers—46 of which were characterized by copy number gains that were concomitant with overexpression and 1 with a copy number loss and downregulation. Two of these genes were selected for further validation: *PLXDC2* and *GNB3*. *GNB3* was overexpressed and *PLXDC2* was downregulated compared with normal samples. By IHC, both proteins were ubiquitously expressed throughout vulvar tissue. High expression of *GNB3* and low *PLXDC2* immunostaining in the same sample was linked to less lymph node metastasis ($p=0.016$) and greater disease-free survival ($p=0.005$). Based on a robust methodology never used before for VSCC evaluation, this study proposes 2 novel prognostic markers in vulvar cancer. *GNB3* is associated with a good prognosis, and *PLXDC2* correlates with worse outcomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Perfil de ganhos e perdas de cópias genômicas das 18 amostras submetidas à técnica de CGH-array, realizados no software–NEXUS versão 5.0.....	34
Figura 2	Perfil de expressão gênica em relação a Invasão Vascular.....	42
Figura 3	Perfil de expressão gênica em relação à Profundidade da invasão tumoral.....	43
Figura 4	Principais redes genicas associadas aos genes classificados como possíveis moduladores do carcinoma vulvar (Análise IPA) – Rede 1.....	47
Figura 5	Padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas PLXDC2 e GNB3 baseado na avaliação por Hscore.....	57
Figura 6	Sobrevida Cancer Específica (SCE) e Sobrevida Livre de Doença (SLD) associadas à expressão de GNB3 e PLXDC2..	60

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Sequência e condições dos primers utilizados para a quantificação absoluta por RT-PCR para os genes <i>GNB3</i> e <i>PLXDC2</i>	24
Tabela 2	Tipo e número de alterações significativas no número de cópias gênicas por amostra de carcinoma vulvar avaliada pela técnica de CGH-array.....	32
Tabela 3	Lista de 47 genes selecionados como possíveis moduladores baseados na análise integrada dos dados de CGH-array e expressão em larga escala realizada pelo algoritmo CONEXIC.....	44
Tabela 4	Associação da expressão dos 47 possíveis moduladores do carcinoma vulvar com diagnóstico histológico, estadiamento FIGO, infecção por HPV, infiltrado inflamatório, invasão perineural e invasão vascular.....	48
Tabela 5	Associação da expressão dos 47 possíveis moduladores do carcinoma vulvar com metástase linfonodal profundidade de invasão e recidiva.....	50
Tabela 6	Quantificação relativa e absoluta dos genes <i>GNB3</i> e <i>PLXDC2</i> pela técnica de RT-PCR em amostras de carcinoma vulvar.....	53
Tabela 7	Associação entre o número de cópias obtida por meio da técnica de quantificação absoluta por PCR e variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney).....	54

Tabela 8	Associação entre a expressão gênica obtida por meio da técnica de qRT-PCR e variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares(Mann-Whitney).....	55
Tabela 9	Associação dos valores da expressão das proteínas PLXDC2 e GNB3 com variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney).....	58
Tabela 10	Associação da expressão inversa de GNB3 e PLXDC2 com variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney).....	61
Quadro 1	Classificação das amostras de tecido a fresco utilizadas nas técnicas de CGH-array e expressão em larga escala....	30
Quadro 2	Alterações significativas presentes em mais de 20% das amostras de carcinomas vulvares avaliadas pela metodologia de CGH-array.....	36
Quadro 3	Validação da avaliação funcional in silico dos 47 genes candidatos a moduladores realizada no software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) pelo software de livre acesso KOBAS 2.0.....	45

LISTA DE ABREVIações

aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
CGH-array	Hibridação genômica comparativa por array
c-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CEC	Carcinoma escamoso
CNV	Varição no número de cópias genômicas
CONEXIC	<i>Copy Number and Expression in Cancer</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDR	<i>False discovery ratio</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
FIGO	Federação internacional de ginecologia e obstetrícia
GNB3	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide</i> 3
GWE	<i>Genome-wide expression</i>
HPV	Papillomavírus humano
HR-CGH	Hibridação genômica comparativa de alta resolução
IHQ	Imunoistoquímica
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i> software
KOBAS	<i>KEGG Orthology Based Annotation System</i>
LOH	Perda de heterozigose
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS-MLPA	<i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NIV	Neoplasia intraepithelial vulvar
PLXDC2	Plexin domain containing 2
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SCE	Sobrevida câncer específica

SLD	Sobrevida livre de doença
SNPs	Polimorfismos em nucleotídeos únicos
TMA	<i>Tissue microarray</i>
VSCC	<i>Vulvar squamous cell carcinoma</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer de vulva – Caracterização e Epidemiologia	1
1.2	Aspectos anatomopatológicos.....	2
1.3	Manejo dos carcinomas vulvares	5
1.4	Avanços no conhecimento da biologia do carcinoma vuvar	7
1.4.1	Avaliações proteicas.....	7
1.4.2	Avaliações genômicas e epigenéticas.....	8
1.4.3	Análise Integrada – alterações genômicas e transcriptômicas	11
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos	14
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1	Pacientes e espécimes anatomopatológicos.....	16
4.2	A extração de RNA de tecido a fresco.....	17
4.3	Extração de DNA de tecido a fresco.....	18
4.4	Reação de CGH-array	19
4.5	Expressão gênica em larga escala.....	21
4.6	Análise integrada de dados genômicos e transcriptômicos	22
4.7	Reação de Polimerização em Cadeia do DNA (PCR) em Tempo Real	23
4.8	Confecção de Lâminas de Micro arranjo em Matriz de Tecidos (tissue microarray – TMA)	26
4.9	A imuno-histoquímica (IHQ)	26
4.10	A análise estatística.....	27

5	RESULTADOS	29
5.1	Análises de CGH-array.....	31
5.2	Análise de expressão em larga escala.....	40
5.3	Análise integrada.....	43
5.4	Validações – qRT-PCR.....	52
5.5	Imuno-histoquímica.....	56
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Quadro referente as características adotadas para estabelecer o estadiamento FIGO atualizado em 2014.
- Anexo 3** Artigo publicado na revista Molecular Cancer Research, 2016; 14(8):720-9.
- Anexo 4** Artigo publicado na revista BMC Cancer em 2014 em parceria com a doutora Erika Mie Akagi referente a dados obtidos no presente trabalho.
- Anexo 5** Artigo em fase de revisão referente a projeto paralelo desenvolvido durante o período de doutorado.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE VULVA: CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Os cânceres femininos são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade desse gênero. Entre os tumores ginecológicos, o câncer vulvar invasivo é o quarto tumor mais frequente, correspondendo a cerca de 3 a 5% das neoplasias genitais femininas (FRISTACHI et al. 2004; BUXANT et al. 2005; STROUP et al. 2008; WANG et al. 2008). A incidência mundial dessa neoplasia é de, aproximadamente 1,8/100.000 mulheres, aumentando para até 20/100.000 após a idade de 75 anos (PINTO 2002; FRISTACHI et al. 2004).

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer demonstraram que entre os anos 2000 e 2005 a cidade com a maior incidência foi encontrada em São Paulo com 1,44/100.000 mulheres (Ministério da Saúde 2010). Até a idade de 60 anos, a incidência em todo território nacional chegou a 1,67/100.000 mulheres, após essa idade a incidência aumentou rapidamente e chegou a 20,87/100.000 mulheres após a idade de 85 anos (Ministério da Saúde 2010). Dados atuais brasileiros são escassos, contudo, nos EUA os carcinomas vulvares representarão 5.950 casos de câncer dos quais 1.110 evoluirão para óbito em 2016 (American Cancer Society-ACS 2016).

A vulva é representada pela área imediatamente após a vagina e compreende o monte púbico, grandes e pequenos lábios, clitóris e períneo. Dessas regiões os grandes lábios são as mais frequentemente acometida pelo carcinoma vulvar, representando aproximadamente 50% do total de casos, seguidos pelos pequenos lábios e por fim, com uma baixa frequência, as demais estruturas (MACNAB et al. 1986).

Estudos prévios consideravam o carcinoma vulvar como uma enfermidade de mulheres em idade avançada, contudo o aumento de casos em mulheres jovens, aliado ao já esperado aumento nas ocorrências em mulheres acima dos 70 anos, tem sido observado nos últimos anos (FRISTACHI et al. 2004; BUXANT et al. 2005; WANG et al. 2008). Este aumento está relacionado, especialmente, ao tabagismo e à infecção pelo *Papillomavirus* Humano (HPV) (HUSSAIN et al. 2008).

1.2 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

As neoplasias intraepiteliais *in situ* (NIV), lesões precursoras do carcinoma epidermóide vulvar, são classificadas quanto a sua relação ou não com a infecção por HPV. Elas são classificadas em usual (clássica, ou bowenóide) quando associada à infecção por HPV, ou diferenciada (ou simplex) quando não está associada à infecção por HPV. A primeira ocorre predominantemente em pacientes mais jovens e tende a ser multifocal e multicêntrica, já a segunda acomete mulheres mais velhas e é menos comum que a NIV usual, além de poder estar associada ao Líquen

Escleroso, uma desordem não-neoplásica da mucosa e pele vulvar (VAN SETERS et al. 2007).

Dos carcinomas vulvares invasivos, os tumores epiteliais escamosos representam a grande maioria (90%), e podem ser divididos em subtipos histológicos distintos, designados como basalóide, condilomatoso, verrucoso e queratinizado/não queratinizado, sendo que os dois primeiros estão relacionados à infecção por HPV, enquanto os de tipo verrucoso e queratinizado/não queratinizado parecem não ter relação com este tipo de infecção viral (KURMAN et al. 1993; KNOPP et al. 2006, 2009). Como consequência da associação dos mesmos com a presença ou ausência de infecção por HPV os mesmos muitas vezes também se associam com processos de progressão tumoral envolvendo VINs usuais no caso dos tumores basalóides e condilomatosos e à VINs diferenciadas nos carcinomas verrucosos e queratinizados/não queratinizados.

O tipo viral de HPV mais comum entre os cânceres vulvares é o HPV 16 (DENNY e NGAN 2006; INSINGA et al. 2008) que é um tipo de alto grau de malignidade (ZUR HAUSEN 2002). Tanto ele quanto outros tipos de alto risco podem codificar as oncoproteínas E6 e E7, que são capazes de imortalizar independentemente diversos tipos de células humanas por interagirem, regularem e degradarem os supressores tumorais pRb e p53, respectivamente (ZUR HAUSEN 2002).

O estadiamento dos carcinomas vulvares é feito habitualmente pela adoção de parâmetros estabelecidos pela *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO), uma entidade internacional que norteia

as práticas no campo da ginecologia e obstetrícia. A atualização mais recente data de 2014 e, a grosso modo, conta com quatro divisões (FIGO I a FIGO IV) que estadiam os tumores a partir de características como: tamanho da lesão, invasão, acometimento locorregional ou a distância e comprometimento linfonodal (Committee on Gynecologic Oncology-FIGO 2014). Uma adaptação das recomendações para estadiamento de carcinomas vulvares se encontra disponível no **Anexo 2**.

A metástase linfonodal vem sendo recorrentemente avaliada dada a sua importância nos carcinomas vulvares (PIURA et al. 1993; MAGGINO et al. 2000; BAIOCCHI et al. 2013a e b; LAVORATO-ROCHA et al. 2013a). A positividade de células tumorais nos linfonodos superficiais e/ou inguinais é um fator preponderante para o estadiamento da doença e também para o prognóstico da mesma (BAIOCCHI et al. 2013a e b). Nesse contexto a sobrevida de pacientes com presença 5 ou 6 linfonodos positivos pode fazer com que a sobrevida em cinco anos seja de 24%, valor consideravelmente inferior àquele observado nos tumores não metastáticos (90%) (HOMESLEY et al. 1991). Em um trabalho de BAIOCCHI et al. (2013a) foi observado que a positividade de 1 a 2 linfonodos é capaz de reduzir a sobrevida câncer específica de 78,2% para 48,7% e quando o número de linfonodos positivos é ainda maior essa taxa chega a 30,1%, demonstrando a íntima e importante relação entre a metástase linfonodal e o prognóstico dos carcinomas vulvares e corroborando com o seu uso para segregar os estádios mais iniciais (FIGO I e II) daqueles mais avançados (FIGO III e IV).

1.3 MANEJO DOS CARCINOMAS VULVARES

Os carcinomas vulvares tem a cirurgia como padrão ouro de tratamento (BAIOCCHI e ROCHA 2014), contudo outras modalidades tais quais radioterapia e quimioterapia também podem ser adotadas a depender do estadiamento da doença (SHYLASREE et al. 2011).

As modalidades cirúrgicas sofreram grandes alterações a partir do início do século 20, quando TAUSSIG (1940) e WAY (1960) intruduziram a cirurgia *em bloco* que apresentou num primeiro momento um expressivo ganho de sobrevida nas pacientes portadoras de carcinoma vulvar, contudo a agressividade de tal metodologia gerava morbidades significativas (BAIOCCHI e ROCHA 2014). Uma alternativa segura e que apresenta menores taxa de morbidade é a alternativa de realizar a cirurgia por meio do método de *tripla incisão* que consiste na remoção do sítio primário tumoral junto a linfadenectomia inguinfemoral (LIN et al. 1992; BAIOCCHI e ROCHA 2014). Outra alternativa à vulvectomia radical praticada na cirurgia *em bloco* é a *excisão local ampliada/radical*. Esse método consiste na remoção completa do tumor com margens de segurança macroscópicas de 2cm e com margens à microscopia de pelo menos 1mm (BAIOCCHI e ROCHA 2014). Esse método, apesar de possuir algumas controvérsias no que tange o tamanho das margens, já apresentou-se eficiente na redução de recorrência locais (DE HULLU et al. 2000; CHAN et al. 2007; BAIOCCHI e ROCHA 2014).

Outros avanços nos métodos cirúrgicos foram alcançados a partir de dois *clinical trials* dos quais é possível sugerir que a metodologia de avaliação do linfonodo sentinela pode auxiliar no tratamento da doença uma vez que pode prevenir as morbidades associadas à prática da linfadenectomia inguinfemoral, principalmente quando é realizada em tumores unifocais menores que 4cm e por cirurgiões experientes (VAN DER ZEE et al. 2008; LEVENBACK et al. 2012; BAIOCCHI e ROCHA 2014).

A radioterapia aparece no contexto das possibilidades terapêuticas principalmente como adjuvante à métodos cirúrgicos após comprovada metástase em linfonodos (WOELBER et al. 2011). Em linfonodos pélvicos a radioterapia apresenta resultados similares ou até melhores daqueles obtidos por métodos de linfadenectomia ipsilaterais (KUNOS et al. 2009). Em alguns casos inoperáveis a radiação massiva pode ser uma alternativa viável (KUMAR et al. 1988).

O uso de drogas sistêmicas afim de tratar os carcinomas vulvares não é uma prática usual tendo em vista que os quimioterápicos são mais utilizados em tumores avançados, inoperáveis ou com metástases ao diagnóstico (EIFEL et al. 1995; LANDONI et al. 1996; MOORE et al. 1998; MONTANA et al. 2000; SCHEISTRÖEN e TROPÉ 2003).

1.4 AVANÇOS NO CONHECIMENTO DA BIOLOGIA DO CARCINOMA VUVAR

1.4.1 Avaliações proteicas

As últimas décadas foram marcadas por avanços em todos os campos da oncologia e um dos mais marcantes foi a admissão e o aumento do uso de marcadores proteicos para a avaliação prognóstica e para a introdução de tratamentos alvo específico. Em carcinomas vulvares intensos esforços vem sendo feitos afim de identificar os mecanismos pelos quais a doença se estabelece, progride e quais são aqueles que podem ser usados na pratica clínica (KNOPP et al. 2009; DE MELO MAIA et al. 2012, 2013; LAVORATO-ROCHA et al. 2013a e b; RODRIGUES et al. 2013; LAVORATO-ROCHA et al. 2015).

Entre os achados mais relevantes estão a associação da expressão da proteína p14 com pior prognóstico e de c-KIT e PTEN com bom prognóstico além de resultados inconclusivos e conflitantes na associação entre as expressões de p16 com a infecção por HPV e de p53 com tumores mais mais agressivos (KNOPP et al. 2009; DE MELO MAIA et al. 2012; LAVORATO-ROCHA et al. 2013a e b).

A avaliação da expressão do componente invasivo comparando-o ao centro dos carcinomas vulvares descrito em um trabalho de RODRIGUES et al. (2013) demonstrou a associação que a expressão de β -catenina tem o potencial para auxiliar o prognóstico dessa doença uma vez que se relaciona a pior sobrevida.

Apesar de tantos avanços a avaliação proteica ainda não é rotineiramente utilizada na prática clínica do carcinoma vulvar e a utilização de metodologias de biologia molecular vem auxiliando-a na avaliação e descrição dessa doença.

1.4.2 Avaliações genômicas e epigenéticas

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

Utilizando a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), KUNJOONJU et al. (2005) demonstraram que a perda do gene *TMSB10* envolvido no controle do crescimento e diferenciação celular, foi a alteração mais frequentemente observada em linhagens celulares de vulva. A técnica MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) foi empregada em estudos envolvendo o carcinoma vulvar, para avaliar as alterações epigenéticas e revelou que o gene *TP73* envolvido na regulação do ciclo celular é o mais frequentemente afetado por essas alterações (STEPHEN et al. 2009).

Técnicas clássicas de citogenética aplicadas aos carcinomas vulvares já revelaram rearranjos em 11p, perdas em 3p, 5q, 8p 10q 15q 19p 22q, Xp, e ganhos em 3q (WORSHAM et al. 1991; SWANSON et al. 1997; PINTO et al. 1999; TEIXEIRA et al. 1999).

Em relação à técnica de hibridação genômica comparativa (CGH) são poucos os dados a respeito das variações de cópias genômicas em carcinomas vulvares. Em 2001, o primeiro relato envolvendo 10 amostras de carcinomas vulvares utilizando a metodologia de CGH encontrou perdas em 4p13-pter (porção terminal telomérica) e ganhos em 3q como as alterações mais frequentes, além de perdas em 3p, 5q, 6q e 13q e também ganhos em 8q (JEE et al. 2001). As alterações envolvendo perdas em 3p e ganhos em 3q foram confirmadas por outros trabalhos em carcinomas vulvares que se seguiram (ALLEN et al. 2002; BRYNDORF et al. 2004; RAITANEN et al. 2004; HUANG et al. 2005). Os ganhos em 3q já foram descritos em diversos tumores sólidos como de cabeça e pescoço (KUJAWSKI et al. 1999) e são vistos como um possível mecanismo de carcinogênese por abrigar diversos candidatos a oncogenes (HUANG et al. 2005). Outro achado recorrente nos carcinomas vulvares foi o ganho do braço longo do cromossomo 8 e perda do braço curto do mesmo cromossomo (ALLEN et al. 2002; BRYNDORF et al. 2004; RAITANEN et al. 2004; HUANG et al. 2005). Assim como proposto para os ganhos em 3q, os ganhos em 8q parecem estar relacionados com a carcinogênese uma vez que abriga *c-MYC*, um já conhecido oncogene além de outros candidatos (HUANG et al. 2005).

Como descrito anteriormente, a infecção por HPV divide em duas vias distintas a carcinogênese do carcinoma vulvar, sendo uma delas relacionada com a infecção e a outra com processos de acumulação de alterações ao longo da vida (CRUM 1992; HØRDING et al. 1994). Com o intuito de elucidar os mecanismos ativados em cada grupo no processo de carcinogênese,

estudos de hibridação genômica comparativa tentaram, portanto, distinguir alterações particulares àquelas amostras infectadas pelo HPV em comparação com as sem infecção (ALLEN et al. 2002; BRYNDORF et al. 2004; HUANG et al. 2005). Para tanto, ALLEN et al. (2002) conduziram um estudo com 18 amostras, 8 HPV negativas e 10 positivas, e encontraram um ganho significativamente maior de 3q por parte do grupo HPV positivo, enquanto o grupo HPV negativo obteve um ganho maior em 8q. Tais achados não foram confirmados até o momento, uma vez que BRYNDORF et al. (2004) encontraram uma distribuição homogênea entre os dois grupos em relação aos ganhos em 3q.

Outro processo ainda discutido é o papel da NIV III na progressão para o carcinoma vulvar, que apesar de estar sob investigação já é tratada com excisão local ou terapia a laser como recomenda o National Cancer Institute (National Cancer Institute-NCI 2016). Na tentativa de elucidar o seu papel, um trabalho pioneiro utilizando hibridação genômica comparativa de alta resolução (HR-CGH) comparou os achados entre NIV I, II e III com condilomas e carcinomas vulvares invasivos. Os achados encontrados nas NIV I e II foram pouco relevantes, e nos condilomas nenhuma alteração foi encontrada; contudo, nos casos NIV III muitas aberrações foram encontradas (BRYNDORF et al. 2004), assim como é visto nos carcinomas invasivos vulvares (JEE et al. 2001; ALLEN et al. 2002; BRYNDORF et al. 2004; RAITANEN et al. 2004; HUANG et al. 2005). Interessante ressaltar que apesar do número limitado amostral e do grande número de alterações encontradas, os achados mais frequentes nas NIV III foram ganhos do

cromossomo 1, alteração não compartilhada pelos carcinomas vulvares no mesmo estudo (BRYNDORF et al. 2004).

Nenhum dos trabalhos publicados até o momento envolvendo carcinomas vulvares e variação no número de cópias do DNA investiga a relação das alterações genômicas com fatores prognósticos, nem tampouco realizaram a investigação de genes que possam estar envolvidos na carcinogênese vulvar.

1.4.3 Análise Integrada – alterações genômicas e transcriptômicas

Existe uma crescente tendência em combinar os achados genômicos com os perfis transcriptômicos com o intuito de avaliar a relação das variações no número de cópias do DNA com alterações de expressão gênica (CIFOLA et al. 2008). As técnicas de microarray abordando *status* do DNA [número de cópias, *single nucleotide polymorphism* (SNPs) e perda de heterozigose (LOH)] já foram descritas em carcinomas de mama (JUNG et al. 2009; CIRILO et al. 2013), gástrico (TSUKAMOTO et al. 2008) e carcinomas renais (CIFOLA et al. 2008) e nesses trabalhos foram encontradas influências das aberrações no perfil de expressão. O perfil de expressão gênica utilizando análise em larga escala tem se mostrado uma ferramenta poderosa para predizer o comportamento tumoral. Essa metodologia permite que o prognóstico seja mais apurado que o estabelecido somente pelas variáveis clínicas (HAWTHORN et al. 2010).

Poucos estudos de carcinomas vulvares apresentaram análise de expressão gênica e quase todos os que o fizeram até o momento

envolveram a expressão de genes específicos (MICHALSKI et al. 2001, 2003; OLEJEK et al. 2002). Somente um trabalho até o momento realizou uma vasta investigação de expressão e a integrou com dados de variações no número de cópias genômicas números utilizando plataformas de larga escala (MICCI et al. 2013), contudo a avaliação do mesmo não levou em consideração dados estatísticos para a seleção de genes que fossem concomitantemente alterados em ambas plataformas o que não limita a associação dos genes selecionados com o conceito de genes moduladores do câncer. Portanto, mesmo que alguns estudos de anormalidades já tenham sido publicados, o processo molecular de aquisição de múltiplas alterações necessárias para a carcinogênese ainda é pouco conhecido em carcinomas vulvares invasivos.

2 JUSTIFICATIVA

Os poucos estudos em larga escala realizados até o momento em carcinomas vulvares demonstraram algumas regiões frequentemente alteradas no DNA e outras com papel controverso na carcinogênese vulvar, porém em nenhum desses trabalhos essas alterações foram validadas e nenhum gene candidato foi estabelecido.

Encontrar genes envolvidos na carcinogênese e na progressão do carcinoma vulvar é uma tarefa importante, uma vez que apesar da raridade desse tumor o seu tratamento geralmente leva a sequelas deixadas pelas cirurgias mutiladoras que são realizadas nesses pacientes. Portanto, o conhecimento de novos fatores prognósticos pode auxiliar no desenvolvimento de abordagens mais adequadas de tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores moleculares que possam estar envolvidos na progressão do carcinoma vulvar, através da análise integrada envolvendo dados resultantes dos perfis de alterações genômicas e de expressão gênica, e assim determinar melhores e mais acurados valores prognósticos nesse tipo tumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar, através de CGH-array regiões do DNA com variações no número de cópias
- 2 Avaliar, através de análise de expressão gênica em larga escala, genes com expressão alterada.
- 3 Integrar os dados de expressão gênica e de CGH-array para identificar genes diferencialmente expressos associados a alterações no número de cópias de DNA
- 4 Validar por meio de qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) os genes diferencialmente expressos associados com ganhos e perdas no número de cópias do DNA.

- 5 Validar por imuno-histoquímica os achados das análises integradas confirmados pela técnica de qRT-PCR.
- 6 Associar a expressão proteica e gênica com fatores prognósticos bem estabelecidos em anatomia patológica, dados clínicos das pacientes e tempo de sobrevida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES E ESPÉCIMES ANATOMOPATOLÓGICOS

Dezoito amostras de tecido a fresco de carcinomas invasivos vulvares foram selecionados de forma retrospectiva dos arquivos do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center no período de janeiro de 1990 a dezembro 2010. Foram considerados critérios de inclusão apresentar diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermóide invasor da vulva, e de exclusão casos com radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes e os casos que não depuseram de material suficiente para as análises ou que apresentaram falta de informações clínicas. As amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina para as análises imuno-histoquímicas foram obtidas do Arquivo da Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Foram selecionadas 150 amostras de carcinoma vulvar que foram incluídas em um *tissue microarray* (TMA). A confirmação diagnóstica foi realizada pela análise do H&E por uma patologista com grande expertise em tumores ginecológicos. Todas as 18 amostras de tecido a fresco disponíveis destes tumores foram resgatadas para a extração de DNA e RNA para a realização do *CGH-array*, análise de expressão gênica em larga escala e qRT-PCR. Amostras de tecido normal adjacente ao tumor foram resgatadas, das mesmas amostras selecionadas para esse trabalho para a obtenção de RNA. Esses tecidos normais foram possíveis de ser obtidos de 11 amostras

e as mesmas foram utilizadas na forma de um *pool* de amostras normais. A extração das moléculas de DNA e RNA foi realizada pelo laboratório de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center. A tipagem dos HPVs foi realizada em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa por meio da metodologia AMPLICOR® HPV test - *LINEAR ARRAY* (Roche) (RODRIGUES et al. 2013). Os seguintes dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos das pacientes foram coletados dos prontuários do hospital: etnia, estado civil, escolaridade, uso de anticoncepcional, hábitos etílicos e tabagistas, número de parceiros sexuais, de gestações e de partos, idade ao diagnóstico, à menarca, à coitarca e menopausa, sintomas e duração dos mesmos, tratamentos, estadiamento, presença e padrão da recidiva, status no último segmento, tipo histológico, invasão vascular e perineural, metástase linfonodal e profundidade da invasão.

4.2 A EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDO A FRESCO

Para a extração de RNA foram utilizados o *RNeasy Mini Kit* e o equipamento Precellys® seguindo todas as especificações técnicas do Kit de extração e do equipamento para maior rendimento e qualidade das amostras. Em resumo, foram adicionados 10 µl de β-Mercaptaetanol (β-ME) para cada 1 ml Buffer RLT. Em temperatura ambiente, foram pipetados 600 µl do Buffer RLT nos tubos com beads magnéticos do Kit Precellys® para proceder com a lise. Em sequência o conteúdo do tubo de bead magnético foi transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5 ml e centrifugado. O

sobrenadante foi transferido para um novo tubo e usado para as outras reações enquanto o pellet foi armazenado para a extração de DNA. Ao lísido foi adicionado o mesmo volume de etanol 80% que foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta. Então, 700 µl dessa solução homogênea foram transferidos para a coluna RNeasy spin column. Em seguida uma série de reagentes fornecidos pelo Kit foram adicionados e centrifugados na coluna com o intuito de purificar o RNA.

As amostras foram reavaliadas pelo patologista responsável pelo Biobanco antes da extração para que somente a região tumoral fosse extraída. Ao final as amostras extraídas foram alíquotas e armazenadas em freezer à -80°C até o momento da utilização.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO A FRESCO

Como previamente descrito o material usado para a obtenção de DNA foi proveniente do pellet formado a partir da reação de extração de RNA. Para tal, foram adicionados 600 µl do tampão *Cell Lysis Solution* (Gentra Puregene Blood Kit - Qiagen) no pellet e em seguida essa solução foi incubada a 55°C em agitação (300rpm) por 18 horas. Seguida à incubação o tubo *Phase Lock Gel* (PLG) foi centrifugado. As amostras então foram transferidas para o tubo PLG e à essa foi adicionado fenol-clorofórmio-álcool isoamílico após cada centrifugação. Em seguida a fase aquosa gerada foi transferida para um novo tubo (2,0 ml) e então foi adicionado 0,5 µl de glicogênio (20 mg/ml) e 800 µl de etanol 100 % gelado. Essa solução foi

homogeneizada por inversão e incubada por 1 hora a -20°C . Este tempo passado o tubo foi centrifugado por 30 min a 14.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi removido. O pellet foi lavado 3 vezes com 1 ml de álcool 70% gelado e em cada processo ele foi ressuspendido e centrifugado por 2min a 14.000 rpm a 4°C . O sobrenadante formado foi removido e o pellet seco à temperatura ambiente. Para ressuspender o pellet foram adicionados $\sim 30 \mu\text{l}$ de H_2O . Após ressuspendê-lo a solução foi incubada a 55°C por 10 minutos e em seguida foi deixada *overnight* a 4°C . Por fim a quantificação do DNA e a avaliação de sua integridade com $0,5 \mu\text{g}$ em gel de agarose 0,8% foram realizadas. Para armazenar o material foi colocado em freezer -20°C .

4.4 REAÇÃO DE CGH-ARRAY

Foram utilizadas para este estudo 18 amostras de carcinomas de vulva de pacientes que previamente concordaram em doar a amostra tumoral para a pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Essas amostras encontravam-se no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. Os dados de variações no número de cópias foram gerados utilizando a plataforma de *oligonucleotídeos 8x60K* (Agilent), representada por sequências codificantes e não-codificantes do genoma humano. A marcação das amostras foi realizada com o kit *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic labeling* (Agilent), de acordo com as especificações do fabricante. Como referência, foram utilizadas amostras comercialmente disponíveis de DNA normal feminino,

Human Genomic DNA: Female (Promega). A captura das imagens foi realizada no aparelho *DNA microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology* (Agilent), utilizando-se o *Scan Control Software 8.1* e os dados foram extraídos pelo programa *Feature Extraction v 10.5* (Agilent). A análise dos dados de CGH foi feita utilizando o software *Nexus Copy Number™ v5.0* (BioDiscovery Inc., USA), e apenas as alterações que contenham, no mínimo, cinco oligonucleotídeos consecutivos com razão \log_2 alterada foram consideradas como uma possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico. Nessas análises ampliações gênicas foram consideradas quando os ganhos fossem maiores que 0.8, ganhos no número de cópias quando maiores que 0.3, perdas quando menores que -0.3 e perdas em homozigose quando menores que -1.2. Alterações no número de cópias (CNAs) foram comparadas com os dados depositados no *Database of Genomic Variants* (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) e com os dados obtidos de 83 mulheres brasileiras normais, obtidos de um estudo paralelo da equipe para filtrar alterações consideradas como variações normais na população. As regiões genômicas alteradas associadas a mais de três CNAs já descritas foram excluídas da análise.

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA

O perfil de expressão gênica foi avaliado utilizando-se a plataforma *Whole Human Genome 8x60K* (Agilent Technologies®, USA). As amostras normais foram obtidas a partir de borda normal adjacente de 11 dos casos incluídos nesse estudo. Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis* (Agilent Technologies®, USA) que utiliza o *Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies®, USA). Os procedimentos de hibridação e lavagem seguiram as recomendações do fabricante. As lâminas foram digitalizadas utilizando o scanner *DNA Microarray Scanner - G2565CA* (Agilent Technologies®, USA) e os dados extraídos pelo programa *Feature Extraction v10.1.1.1*. Para as análises foi utilizado o programa TMeV v4.5 (www.tm4.org) para obtenção de perfil de expressão gênica e também para identificar genes diferencialmente expressos entre o tumor e o tecido normal. Todos os genes foram considerados alterados quando o a significância atingida foi menor ou igual a $p < 0,05$. Foram considerados com aumento de expressão os genes quando o *fold* se apresentou maior que 2 e menos expressos que o *pool* de amostras normais quando o *fold* foi menor que 0,5. Os genes validados pelo método de SAM e com um *false discovery ratio* < 0.05 foram submetidos a uma análise hierárquica e posteriormente a uma correção estatística pelo método de bonferroni com grau de significância de $p < 0,001$. Os resultados obtidos

foram dispostos em *clusters* associando-os com as variáveis anatomopatológicas.

4.6 ANÁLISE INTEGRADA DE DADOS GENÔMICOS E TRANSCRIPTÔMICOS

A análise integrada do perfil de expressão gênica de mRNA e de *CGH-array* foi realizada em 17 casos de carcinoma vulvar. Os dados genômicos foram correlacionados aos dados de expressão gênica em larga escala, para identificação de genes com alteração no nível transcricional determinada provavelmente por alterações no número de cópias de DNA.

A análise do número de cópias foi realizada utilizando conjunto de dados do genoma (DNAcopy, <http://www.bioconductor.org/packages/2.3/bioc/html/DNAcopy.html>) e o algoritmo JISTIC (SANCHEZ-GARCIA et al. 2010). O JISTIC usa o índice logR para calcular um score G, que representa a intensidade de aberração encontrada em cada sonda. O G-score obtido é comparado com o esperado pelo acaso usando um teste de permutação e os resultados significativos, com um valor de q abaixo de um limiar (0,25), são corrigidos pelo *False Discovery Rate* (FDR) proposto por BENJAMINI e HOCHBERG (1995). A análise da expressão gênica foi realizada utilizando o software R, versão 2.15 (<http://www.bioconductor.org/>) e o software TMEV versão 4.8 (<http://www.tm4.org>). Os dados brutos das intensidades de hibridação foram normalizados em cada um dos *arrays* baseados na mediana de genes centralizadores e *log2-transformed*. Além disso, um filtro

foi aplicado para remover sondas com baixa reprodutibilidade. O algoritmo CONEXIC foi utilizado para integrar dados genômicos e transcriptômicos. Este algoritmo permite associar as CNAs e os dados de expressão para identificar genes moduladores (*driver genes*) e os processos que estes influenciam (AKAVIA et al. 2010). A lista de classificação dos moduladores baseia-se em uma pontuação que quanto mais alta indica uma maior possibilidade do gene possuir vantagem adaptativa no fenótipo tumoral.

4.7 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA DO DNA (PCR) EM TEMPO REAL

O número de cópias de DNA foi avaliado usando dois pares de *primers* construídos para duas regiões abrangidas pelas sondas aCGH de cada um dos genes selecionados para a validação. O desenho dos *primers* foi realizada no software OligoTech versão 1.00 (Oligos Etc. Inc. Therapeutics Inc, Wilsonville, EUA) e a construção dos mesmos foi feita pela empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), a mesma fabricante dos dois genes endógenos utilizadas para a normalização (*HPRT* e *GAPDH*). As especificações de cada um dos primers utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência e condições dos primers utilizados para a quantificação absoluta por RT-PCR para os genes *GNB3* e *PLXDC2*

	Forward primer (5'-3')	TM°	GC%	Reverse primer (5'-3')	TM°	GC%
<i>PLXDC2</i>	GGGTAAAGTAGAAGCATCAT	54.9	40	TACTTAAGGTGAATGGGTAG	53.3	40
<i>PLXDC2</i>	GCCCAGCTTCTTTGATGTAA	61.8	45	TGCTCTTCTGGTGGTAGTTA	57.5	45
<i>GNB3</i>	CATGGAATCAAGGCAGAATC	62	45	AAGTGAGCAACAGAATTAGG	56	40
<i>GNB3</i>	CGTTTGGCCCTGTGACTAT	62.6	52.6	TACCAGGGTGCTACACTTTA	57.3	45

MT° - temperature de *melting*; CG% - porcentagem de guanina (G) e citosina (C)

As reações foram realizadas na placa MicroAmp® Optical de 96 poços (LifeTechnologies, Carlsbad, EUA) utilizando o equipamento Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA), utilizando uma abordagem de quantificação absoluta. Cada reação continha: 10 ul POWER SYBR® Green PCR Master Mix (LifeTechnologies, Carlsbad, EUA), 9µl de água destilada e 0.6µl de primer *forward* e *reverse*. A quantificação de cada sequência de DNA foi realizada normalizando cada amostra com ambos os genes endógenos. As amostras foram caracterizadas com ganhos de cópia quando apresentaram *fold change* acima de 1,5 e com a perda quando menor do que 0,5.

A avaliação da expressão genica foi efetuada utilizando cDNA obtido após a transcrição reversa do RNA total a partir de amostras tumorais e normais adjacentes ao tumor, utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Foram adquiridos *primers* inventariados pela empresa Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) que cobrissem a região das sondas referentes aos genes *PLXDC2* e *GNB3* (Hs01564088_m1 e Hs01019112_g1) incluídas

na plataforma Whole Human Genome 8x60K (Agilent Technologies®, Santa Clara, EUA). Os genes endógenos *HPRT* e *GAPDH* foram utilizados para normalizarem as reações (Hs99999905_m1 e Hs02800695_m1). As reações foram baseadas em tecnologia TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) e utilizaram TaqMan® Universal Master Mix, com UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Todas as reações foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). O método de quantificação relativa foi aplicado para determinar os níveis de expressão dos genes. As amostras com RQ superior a 2,0 foram considerados com hiperexpressão do gene em questão, e aqueles com RQ abaixo de 0,5 foram caracterizados com hipoexpressão.

Os dados obtidos a partir das reações de qRT-PCR dos genes selecionados foram submetidos a uma avaliação funcional *in silico* nos softwares Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) e KOBAS 2.0 (XIE et al. 2011). Para essas avaliações foram consideradas como significativas as associações com valores de $p < 0.005$.

Importante ressaltar que as amostras usadas para a validação dos achados em larga escala foram as mesmas usadas nos testes supracitados e a seleção de genes endógenos seguiu-se após a realização de testes de estabilidade e avaliação pelo software GeNorm.

4.8 CONFECÇÃO DE LÂMINAS DE MICRO ARRANJO EM MATRIZ DE TECIDOS (TISSUE MICROARRAY – TMA)

Cento e cinquenta casos de carcinoma vulvar selecionados após a revisão diagnóstica foram utilizados na confecção de um bloco de TMA. A área tumoral foi identificada no bloco de parafina doador, em seguida foi puncionada com agulha de 1 mm e os cilindros foram transferidos para o bloco receptor. As amostras foram inseridas em duplicata nos respectivos blocos. Em seguida, foi construído um mapa com a identificação detalhada de cada caso para posterior localização destes. Foram realizados cortes sequenciais de 3µm de espessura que foram coletados em lâminas adesivas para a construção de TMA (Instrumedics, Hackensack NJ - EUA).

4.9 A IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Foram realizados dois cortes de quatro micrômetros de espessura do bloco de TMA para avaliação IHQ. A proteína PLXDC2 foi avaliada utilizando anticorpo policlonal anti-PLXDC2 (Abnova, Jhongli, Taiwan) diluído 1µg/ml, utilizando como kit de detecção o ADVANCE™ kit (Dako, Carpinteria, EUA). Para a avaliação da proteína GNB3 foi utilizado o anticorpo policlonal anti-GNB3 (LifeSpan Biociências, Seattle, EUA) diluído 2.5µg/ml, utilizando Universal LSAB™+Kit/HRP - Rabbit/Mouse/Goat (Dako, Carpinteria, EUA), como kit de detecção. Para ambas reações foram utilizados tecidos de cérebro humano como controles para a reação conforme sugerido nas fichas

de especificação técnica dos anticorpos utilizados. O protocolo de IHQ para ambos os kits de detecção utilizaram panela de pressão para recuperação de antigênica por 15 minutos numa solução de TRIS-EDTA, pH9.0. Todas as reações foram reveladas com DAB durante 5 minutos e contra coradas com hematoxilina durante um minuto. As lâminas foram digitalizadas no equipamento Pannoramic 250 Flash II (3dhistech Kft., Budapeste, Hungria) e a quantificação da coloração foi realizada utilizando o software Pannoramic viewer (3dhistech Kft., Budapeste, Hungria) com o algoritmo DensitoQuant. A partir das análises nesse software as amostras receberam um HScore que se baseia na intensidade e porcentagem de pixels marcados e varia de 0 a 300.

4.10 A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram submetidas a uma avaliação da normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As associações entre as variáveis clinico-patológicas e os resultados de qRT-PCR e IHQ foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de qui-quadrado (X^2) foi utilizado na associação da expressão imuno-histoquímica dos grupos PLXDC2^{alta}-GNB3^{baixa} e PLXDC2^{baixa}-GNB3^{alta} com as variáveis clinico-patológicas. Para essas análises foram considerados como baixa expressão todos os casos com valores de HScore iguais ou inferiores a 149 e com alta expressão todos aqueles com valores iguais ou superiores a 150. A mesma classificação foi utilizada para as análises de sobrevida comparando a

expressão conjugada de GNB3 e PLXDC2. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e a significância foi estabelecida pelo teste de log-rank. Para as análises de sobrevida os valores de HScore foram classificados como baixa expressão (0-99), moderada expressão (100-199) e alta expressão (200-300). Todos os testes estatísticos foram realizados no software SPSS® Statistics (IBM®, New York, USA) versão 21.0.0.0 e o valor de significância adotado foi de $p \geq 0.05$.

5 RESULTADOS

Os testes de CGH-array foram realizados em 18 amostras de tecido a fresco provenientes do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. Destas 17 foram utilizadas para a realização da técnica de expressão gênica em larga escala. Uma das amostras não apresentou RNA suficiente para a avaliação da expressão.

Entre os 18 casos avaliados pela técnica de CGH-array 66,7% foi classificado com o tipo histológico Carcinoma de células escamosas de graus 1 ou 2, e 72,2% com estadios mais precoces (FIGO I ou II). Os tumores avaliados também não apresentaram, em sua maioria, invasões perineurais ou vasculares (72,2% dos casos), contudo metástase linfonodal foi encontrada em quase metade dos casos avaliados (44,4%). Em relação a infecção pelo HPV, em especial àqueles de alto risco para o desenvolvimento de processos tumorais, os tumores avaliados apresentaram elevada positividade, representando um total de 66,7% de casos positivos. Todos os dados referentes as características patológicas das amostras utilizadas para as técnicas de CGH-array e posteriormente para a expressão em larga escala estão descritos no Quadro 1. Os dados gerados após a digitalização das lâminas foram extraídos pelo software Feature Extraction e os “*quality reports*” gerados foram avaliados levando-se em consideração os parâmetros de qualidade fornecidos pelo programa. Esses dados foram exportados para o software NEXUS versão 5.0. As

análises geraram outro padrão de qualidade do experimento no qual todas as amostras foram consideradas com índice satisfatório de qualidade, ou seja, $\leq 0,3$.

Quadro 1 - Classificação das amostras de tecido a fresco utilizadas nas técnicas de CGH-array e expressão em larga escala

Amostra	Invasão Vascular	Invasão Perineural	Metástase Linfonodal	Recidiva	HPV	Diagnóstico Histológico	Estadiamento FIGO
V 7T	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	CEC3+Ca Basalóide	FIGO III-IV
V 8T	Neg	Neg	-	Pos	Pos	CEC3+Ca Basalóide	FIGO III-IV
V 9T	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	CEC1+CEC2	FIGO III-IV
V 12T	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 13T	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 15T	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 18T	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	CEC3+Ca Basalóide	FIGO III-IV
V 20T	Neg	Neg	-	-	Pos	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 21T	Neg	Neg	-	Neg	Neg	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 24T	Neg	Neg	-	Pos	Pos	CEC3+Ca Basalóide	FIGO I-II
V 25T	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 27T	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V 30T	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	CEC1+CEC2	FIGO III-IV
V 33T	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	CEC3+Ca Basalóide	FIGO I-II
V34T	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	CEC3+Ca Basalóide	FIGO I-II
V39T	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	CEC1+CEC2	FIGO I-II
V40T	Neg	Pos	Neg	-	Pos	CEC1+CEC2	FIGO III-IV
V22T*	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	CEC1+CEC2	FIGO I-II

CEC – Carcinoma de células escamosas; Ca Basalóide – Carcinoma basalóide; Pos – Positivo; Neg - Negativo

5.1 ANÁLISES DE CGH-ARRAY

Foram filtradas as alterações que se encontravam presentes em um número $\geq 20\%$ das amostras. Essas análises demonstraram que em duas das dezoito amostras utilizadas nenhuma alteração significativa foi identificada. As demais dezesseis amostras apresentaram 234 alterações com uma variação de 18 a 573 alterações em cada amostra. Ganhos de cópias gênicas foram mais frequentes que os eventos de perdas, no entanto ambas alterações ocorreram simultaneamente em todas as dezesseis amostras que apresentaram alterações. Entre as alterações a perda de cópias em homozigose e a amplificação gênica foram observadas em 4 e 11 amostras, respectivamente (Tabela 2).

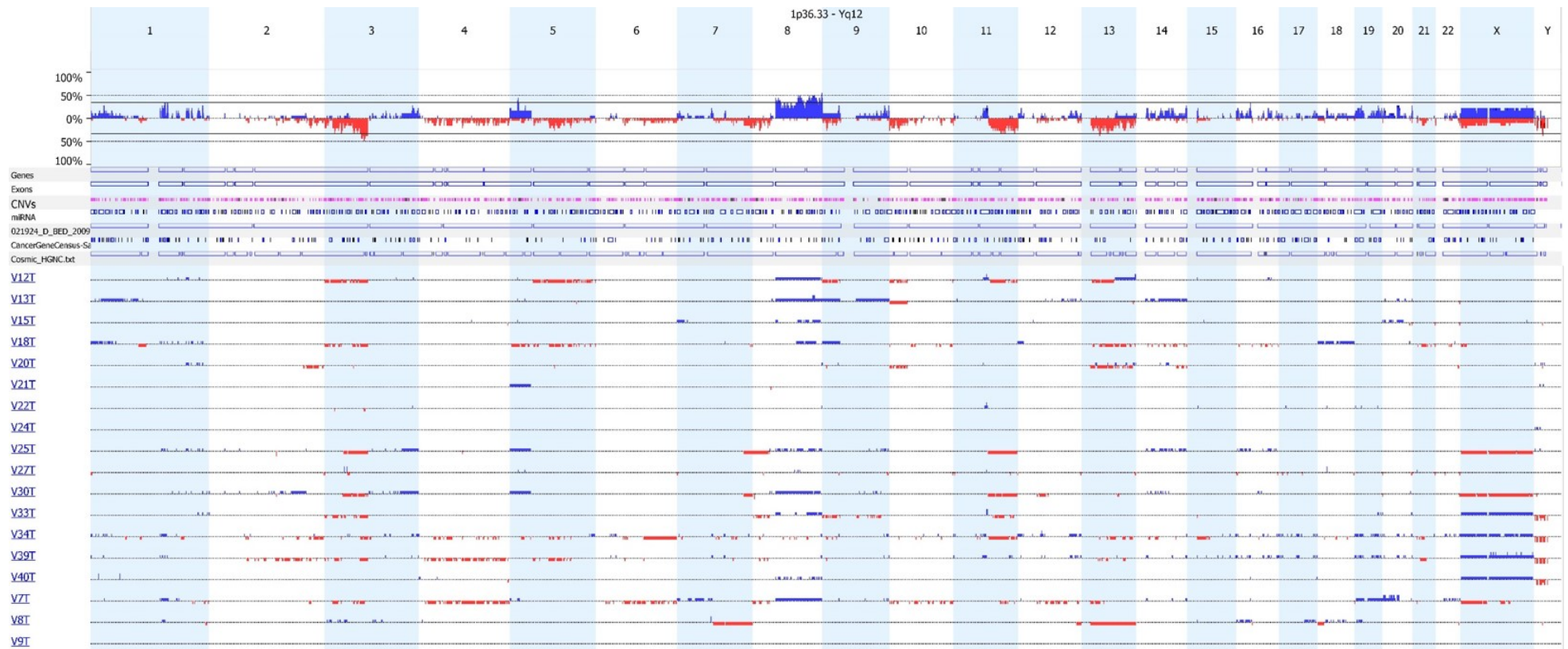
Tabela 2 - Tipo e número de alterações significativas no número de cópias gênicas por amostra de carcinoma vulvar avaliada pela técnica de CGH-array

	AMP	GCG	PCG	PH	GCG/PCG	AMP/GCG	PH/PCG	Total
V07T 2H	5	497	54	0	1	0	0	557
V09T REP 2LAV	0	0	0	0	0	0	0	0
V15T	0	116	6	0	0	0	0	122
V33T	14	39	85	2	0	0	0	140
V34T	0	481	90	2	0	0	0	573
V12T 2H	63	196	97	0	0	8	0	364
V18T 2H	79	162	31	0	0	0	0	272
V22T 2H	12	184	6	0	0	0	0	202
V13T	3	218	11	0	0	0	0	232
V40T	5	27	5	2	0	0	0	39
V21T	0	16	2	0	0	0	0	18
V30T 2LAV	1	52	25	0	0	0	0	78
V39T	4	455	45	2	0	0	1	507
V20T	0	277	17	0	0	0	0	294
V25T	0	61	16	0	0	0	0	77
V24T	0	0	0	0	0	0	0	0
V27T 2H	14	3	93	0	0	0	0	110
V08T	37	62	55	0	1	0	0	155

AMP – Amplificação; GCG – Ganho de cópia gênica; PCG – Perda de cópia gênica; PH – Perda de número de cópia gênica em homocigose; GCG/PCG – Ganho de cópia gênica e Perda e Cópia gênica na mesma região; AMP/GCG – Amplificação e ganho de cópia gênica na mesma região; PH/PCG – Perda de número de cópia gênica em homocigose e perda de cópia gênica na mesma região

As alterações significativas representaram um total de 28 regiões do genoma. Dessas 22 representavam regiões com ganhos no número de cópias contendo 506 genes e 6 regiões de perdas que contém 27 genes. O tamanho médio das alterações encontradas foi de 760kpb. O perfil de cada uma das amostras em relação às perdas e ganhos em cada um dos cromossomos está descrito na Figura 1. O cromossomo Y, apesar de aparecer nas análises, não representa alterações reais, uma vez que todas

as amostras utilizadas eram provenientes de mulheres. As alterações encontradas se tratam de regiões homólogas a outros cromossomos, principalmente o cromossomo X.



Em azul as alterações do tipo ganho de cópias e em vermelho as perdas.

Figura 1 - Perfil de ganhos e perdas de cópias genômicas das 18 amostras submetidas à técnica de CGH-array, realizados no software NEXUS versão 5.0.

A frequência ganhos genômicos variaram entre 22% a 44% das amostras. Ganhos em 3q27.1, 3q27.2-q27.3, e 19p13.2 foram observados em 44% dos casos avaliados; 38.9% demonstraram essa alteração em 9q33.3-q34.11, 9q34.11 11q12.3 11q13.1 11q13.1-q13.2 11q13.2 11q13.3-q13.4, e 16q22.1; 33.3% em 14q24.3; 27.8% em 7p22.3, 7p22.1, 7q11.23, 7q11.23, 7q22.1, 9p13.3, 9p13.3 12p13.31 e 18q11.2; e 22% apresentaram ganhos em 15q11.1-11.2.

As perdas de cópias gênicas foram menos frequentes apresentando somente uma região alterada (3p11.1-q11.1) em mais da metade dos tumores avaliados (55,6%). As regiões mapeadas em 9p23 e 10p12.31 apresentaram-se com perdas em 38.9% das amostras, a região 18q22.1 em 27.8% e as regiões 18p11.21 e 21p11.2 em 22,2% dos casos. Todas as alterações significativas presentes em mais de 20% das amostras e suas respectivas características estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Alterações significativas presentes em mais de 20% das amostras de carcinomas vulvares avaliadas pela metodologia de CGH-array

Região	Tamanho (pb)	Localização	Evento	Genes	miRNAs	P-Value	Símbolo dos genes associados à alteração
chr3:89,509,373-91,000,000	1490627	p11.1 - q11.1	PCG	2	0	0	<i>EPHA3, U3</i>
chr3:183,901,634-183,985,756	84122	q27.1	GCG	7	1	0,011	<i>ABCF3, ALG3, AP2M1, CAMK2N2, ECE2, MIR1224, VWA5B2</i>
chr3:185,441,159-186,199,853	758694	q27.2 - q27.3	GCG	7	1	0,011	<i>C3orf65, DGKG, ETV5, IGF2BP2, LOC253573, LOC344887, TRA2B</i>
chr7:1,018,068-1,561,560	543492	p22.3	GCG	12	1	0,023	<i>AK090593, AK123998, AK127339, C7orf50, CYP2W1, GPER, GPR146, INTS1, MICALL2, MIR339, UNCX, ZFAND2A</i>
chr7:4,742,850-6,686,992	1944142	p22.1	GCG	50	2	0,023	<i>ACTB, AIMP2, ANKRD61, AP5Z1, BC040728, BC044606, BC045805, BC140723, C7orf26, C7orf70, CCZ1, CYTH3, DAGLB, DKFZp686J1569, DL492006, DQ579268, EIF2AK1, FAM220A, FBXL18, FOXK1, FSCN1, GRID2IP, KDELR2, KIAA0415, LOC389458, MIR4656, MIR589, MMD2, Mir_633, OCM, PAPOLB, PMS2, RAC1, RADIL, RBAK, RBAK-LOC389458, RNF216, RNF216-IT1, RNF216P1, RSPH10B, RSPH10B2, SLC29A4, TNRC18, USP42, WIP1, ZDHHC4, ZNF815, ZNF815P, ZNF853, ZNF890P</i>
chr7:72,326,056-73,167,919	841863	q11.23	GCG	37	1	0,003	<i>ABHD11, ABHD11-AS1, AK127026, BAZ1B, BC018166, BC047594, BC050599, BC073780, BC110795, BCL7B, DNAJC30, DQ586658, DQ596866, DQ601342, FKBP6, FZD9, GTF2IP1, GTF2IRD2P1, LOC100093631, LOC541473, MIR4284, MLXIPL, NCF1, NCF1B, NSUN5, NSUN5P2, PMS2L2, POM121, SPDYE7P, SPDYE8P, STAG3L3, STX1A, TBL2, TRIM50, TRIM74, VPS37D, WBSCR22</i>
chr7:73,923,217-74,005,743	82526	q11.23	GCG	1	0	0,003	<i>GTF2IRD1</i>
chr7:100,790,674-101,547,963	757289	q22.1	GCG	18	1	0,003	<i>AK091729, AP1S1, BC027906, BC032716, BC039094, CLDN15, CUX1, EMID2, FIS1, MIR4653, MOGAT3, MYL10, Mir_324, NAT16, PLOD3, RABL5, VGF, ZNHIT1</i>

Cont/ Quadro 2

chr9:9,184,822-9,938,565	753743	p23	PCG	2	0	0,006	<i>Metazoa_SRP, PTPRD</i>
chr9:33,956,788-34,642,450	685662	p13.3	GCG	23	0	0,045	<i>ARID3C, C9orf23, C9orf24, C9orf25, CNTFR, DCAF12, DCTN3, DNAI1, DQ574810, DQ585850, DQ587955, DQ594696, DQ597117, ENHO, FAM219A, KIAA1161, KIF24, LOC415056, NUDT2, RPP25L, SIGMAR1, UBAP1, UBAP2</i>
chr9:34,663,319-35,982,413	1319094	p13.3	GCG	47	1	0,045	<i>ARHGEF39, ATP8B5P, AX748309, C9orf100, C9orf128, C9orf131, CA9, CCDC107, CCL19, CCL21, CD72, CREB3, DNAJB5, DQ580826, DQ589555, FAM166B, FAM205A, FAM205B, FAM214B, FAM221B, FANCG, FP588, GBA2, HINT2, HRCT1, HV041854, KIAA1045, LOC158376, MIR4667, MSMP, NPR2, OR13J1, OR2S2, PIGO, RGP1, RMRP, RUSC2, SIT1, SPAG8, STOML2, TESK1, TLN1, TMEM8B, TPM2, UNC13B, VCP</i>
chr9:130,270,402-130,467,008	196606	q33.3 q34.11	GCG	4	1	0,031	<i>BC032117, FAM129B, MIR3911, STXBP1</i>
chr9:132,396,142-132,602,164	206022	q34.11	GCG	10	0	0,031	<i>ASB6, C9orf78, METTL11A, Mir_652, NTMT1, PRRX2, PTGES, TOR1A, TOR1B, USP20</i>
chr10:19,499,238-20,547,709	1048471	p12.31	PCG	6	0	0,032	<i>AK297683, BC014575, C10orf112, PLXDC2, TRNA_Pseudo, U6</i>
chr11:61,913,851-62,526,862	613011	q12.3	GCG	30	0	0,013	<i>AHNAK, ASRGL1, B3GAT3, BSCL2, C11orf48, C11orf83, EEF1G, EML3, GANAB, GNG3, HNRNPUL2, HNRNPUL2-BSCL2, INCENP, INTS5, LRRN4CL, METTL12, MIR3654, MTA2, ROM1, SCGB1A1, SCGB1D1, SCGB1D2, SCGB1D4, SCGB2A1, SCGB2A2, SNORA57, TTC9C, TUT1, UBXN1, ZBTB3</i>
chr11:63,665,028-64,109,397	444369	q13.1	GCG	25	0	0,013	<i>AX747192, BAD, C11orf20, CCDC88B, COX8A, DNAJC4, ESRRA, FERMT3, FKBP2, FLRT1, GPR137, KCNK4, MACROD1, MARK2, NAA40, NUDT22, OTUB1, PLCB3, PPP1R14B, PRDX5, RCOR2, STIP1, TRMT112, TRPT1, VEGFB</i>

Cont/ Quadro 2

chr11:65,268,668-67,790,779	2522111	q13.1 - q13.2	GCG	119	3	0,013	ACTN3, ACY3, ADRBK1, AF113016, AIP, AK057681, AK091996, AK125412, AK129926, ALDH3B1, ALDH3B2, ANKRD13D, AP5B1, AX746604, AX747485, AX747517, B3GNT1, BANF1, BBS1, BC010924, BRMS1, C11orf68, C11orf72, C11orf80, C11orf86, CABP2, CABP4, CARNS1, CATSPER1, CCDC85B, CCDC87, CCS, CD248, CDK2AP2, CFL1, CLCF1, CNIH2, CORO1B, CST6, CTSF, CTSW, DKFZp434M1735, DKFZp761E198, DOC2GP, DPP3, DQ584669, DQ587981, DRAP1, EFEMP2, EHBP1L1, EIF1AD, FAM86C2P, FAM89B, FIBP, FOSL1, GAL3ST3, GPR152, GSTP1, KAT5, KCNK7, KDM2A, KLC2, LOC100130987, LOC254100, LRFN4, LTBP3, MALAT1, MAP3K11, MIR4489, MIR4690, MIR548AR, MRPL11, MUS81, NDUFV1, NPAS4, NUDT8, OVOL1, PACS1, PC, PCNXL3, PELI3, PITPNM1, POLD4, PPP1CA, PTPRCAP, RAB1B, RAD9A, RBM14, RBM14-RBM4, RBM4, RBM4B, RCE1, RELA, RHOD, RIN1, RNASEH2C, RPS6KB2, SART1, SCYL1, SF3B2, SIPA1, SLC29A2, SNX32, SPTBN2, SSH3, SSSCA1, SYT12, TBC1D10C, TBX10, TMEM134, TMEM151A, TRNA_Ser, TSGA10IP, U7, UNC93B1, X15673, YIF1A, ZDHHC24
chr11:67,813,989-68,223,285	409296	q13.2	GCG	6	0	0,013	AX747648, C11orf24, CHKA, LRP5, SUV420H1, TCIRG1
chr11:69,761,013-70,537,888	776875	q13.3 - q13.4	GCG	12	1	0,013	AK097446, AK125463, AK128563, ANO1, BC127192, BC131767, CTTN, FADD, MIR548K, PPFIA1, SHANK2, SHANK2-AS1
chr12:6,649,349-7,084,848	435499	p13.31	GCG	37	2	0,022	ACRBP, AK096395, AK097957, ATN1, C12orf53, C12orf57, CD4, CDCA3, CHD4, COPS7A, DSTNP2, EMG1, ENO2, GNB3, GPR162, IFFO1, ING4, LAG3, LEPREL2, LPAR5, LRRC23, MIR141, MIR200C, MLF2, NOP2, PHB2, PIANP, PTMS, PTPN6, RPL13P5, RRPL13L, SCARNA11, SCARNA12, SPSB2, TPI1, USP5, ZNF384

Cont/ Quadro 2

chr14:77,348,962-77,556,014	207052	q24.3	GCG	3	0	0,044	AK124327, BC038792, IRF2BPL
chr15:20,102,541-22,646,888	2544347	q11.1 - q11.2	GCG	40	5	0,018	AJ004954, BC107108, CHEK2P2, CT60, CXADRP2, DQ571479, DQ572979, DQ573684, DQ576041, DQ578838, DQ582073, DQ582260, DQ582939, DQ583164, DQ587539, DQ590589, DQ592463, DQ594309, DQ595048, DQ595648, DQ600342, DQ786202, GOLGA6L6, GOLGA8C, GOLGA8CP, HERC2P3, HERC2P7, JA429730, LOC348120, LOC646214, LOC727924, NBEAP1, NF1P2, OR4M2, OR4N3P, OR4N4, POTEb, REREP3, abParts
chr16:67,895,380-68,057,413	162033	q22.1	GCG	13	0	0,017	AK125818, CTRL, DDX28, DPEP2, DPEP3, DUS2L, EDC4, LCAT, NRN1L, NUTF2, PSKH1, PSMB10, SLC12A4
chr18:14,130,295-14,928,854	798559	p11.21	PCG	16	1	0,006	ANKRD20A5P, ANKRD30B, CXADRP3, CYP4F35P, DQ573684, DQ582260, DQ583164, DQ587539, DQ590126, DQ590589, DQ593719, DQ595048, DQ596206, MIR3156-2, POTEC, ZNF519
chr18:19,623,019-20,330,743	707724	q11.2	GCG	2	0	0,002	CTAGE1, GATA6
chr18:62,997,869-63,925,189	927320	q22.1	PCG	1	0	0,031	CDH7
chr19:12,858,097-12,893,837	35740	p13.2	GCG	3	0	0,007	ASNA1, BEST2, HOOK2
chr21:9,833,482-9,834,682	1200	p11.2	PCG	0	0	0	
chrY:6,948,756-7,180,595	231839	p11.2	PCG	2	0	0,018	PRKY, TBL1Y
chrY:17,618,801-19,419,157	1800356	q11.221	PCG	0	0	0,009	

GCG – Ganhos de cópias gênicas; PCG – Perda de cópias gênicas

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA

As análises de expressão em larga escala demonstraram 7951 genes diferencialmente expressos nos tumores avaliados. Entre esses genes, um total de 3842 foram considerados como hiper-expressos em relação ao pool de amostras referência e 4109 como hipo-expressos comparados ao mesmo grupo de amostras.

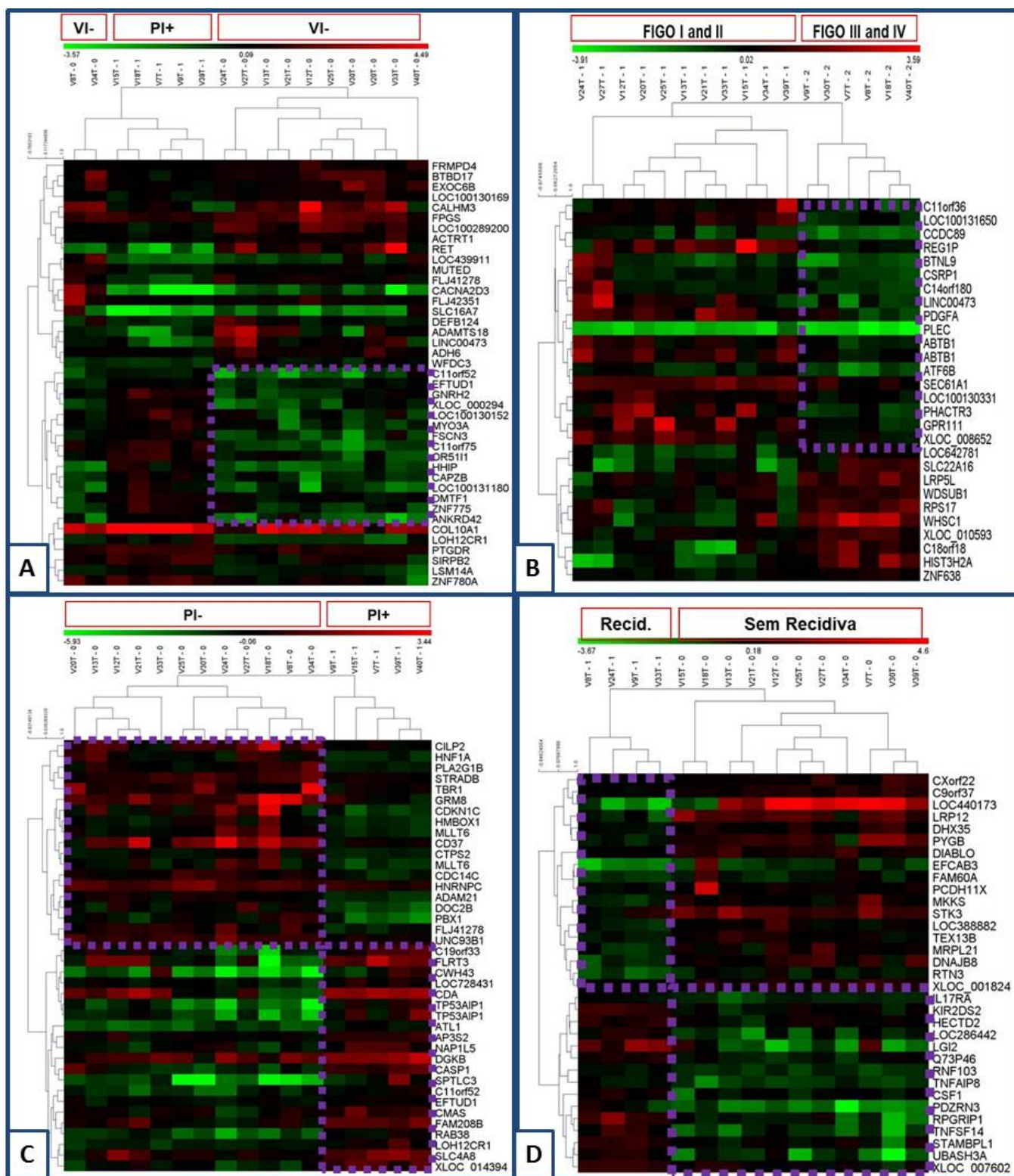
O *fold change* médio dos genes selecionados após a normalização variou de -715.57 para o gene *DCD* (dermcidin) até 16.34 para *AMTN* (amelotin).

Os genes validados pelo método de *SAM* e com um *false discovery ratio* <0.05 foram submetidos a uma análise hierárquica e os resultados obtidos dos *clusters* estão demonstrados nas Figuras 2 e 3.

A partir das avaliações dos *heatmaps* foi possível observar que a partir da expressão de alguns genes foi possível separar os grupos com maior invasão, invasão perineural e recidiva. A avaliação das demais variáveis não demonstrou segregação tão clara, com separação em grupos e visível diferença de expressão gênica para todas as amostras avaliadas, contudo, em alguns casos um set de genes inseridos no total daqueles avaliados ainda foi capaz de diferenciar as amostras quanto as demais variáveis avaliadas: infecção por HPV, tipo e grau diferenciação tumoral, estadiamento, invasão vascular e metástase linfonodal.

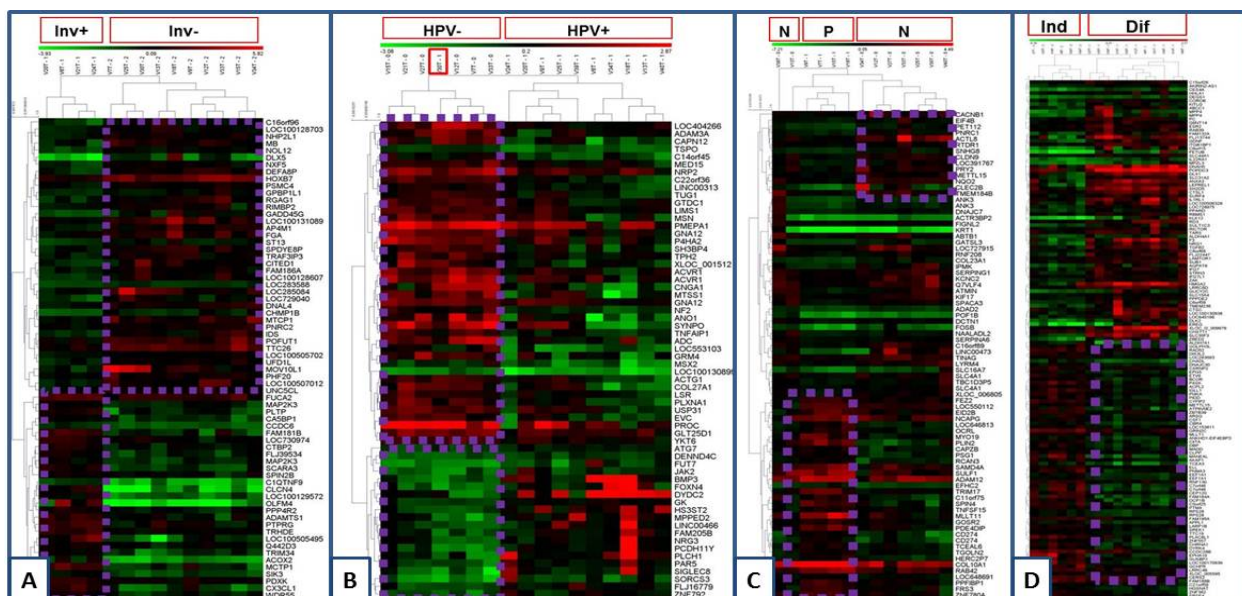
Somente na avaliação das variáveis invasão vascular (Figura 2A), infecção por HPV (Figura 3B) e metástase linfonodal (Figura 3C) ocorreu

alocação de amostras de um grupo em outro *cluster*. Contudo, somente na avaliação a partir da presença ou ausência de infecção por HPV uma amostra positiva para o vírus não apresentou separação nenhuma em relação àquelas HPV negativas.



(VI-) Invasão vascular negativa; (VI+) Invasão vascular positiva; (PI-) Invasão perineural negativa; (PI+) Invasão vascular positiva; (Recid.) Recidiva positiva

Figura 2 – Perfil de expressão gênica em relação a Invasão Vascular (A); Estadiamento FIGO (B); Invasão Perineural (C) e Recidiva (D)



(Inv+) Invasão tumoral na camada submucosa e derme profunda; (Inv-) Invasão tumoral na derme superficial e medial; (HPV-) HPV negativo; (HPV+) HPV positivo; (N) Ausência metástase linfonodal; (P) Presença de metástase linfonodal; (Ind) CEC3/Carcinoma basalóide; (Dif) CEC1/CEC2

*Figura B, retângulo vermelho – Amostra V30T HPV positiva segregou junto às amostras HPV negativas

Figura 3 – Perfil de expressão gênica em relação à Profundidade da invasão tumoral (A); Infecção por HPV (B); Metástase linfonodal (C) e Diagnóstico histológico (D)

5.3 ANÁLISE INTEGRADA

A partir das análises integradas realizadas pelo algoritmo CONEXIC, 47 genes foram selecionados como possíveis moduladores do carcinoma vulvar. Esses genes foram ranqueados de acordo com o score atribuído a cada um deles (Tabela 3). Entre esses genes somente *PLXDC2*, mapeado no braço curto do cromossomo 10, na posição p12.31, foi associado a perda no número de cópias do DNA e redução na expressão gênica. Os demais genes foram associados ao ganho de cópias gênicas concomitantemente à super-expressão dos genes.

Tabela 3 - Lista de 47 genes selecionados como possíveis moduladores baseados na análise integrada dos dados de CGH-array e expressão em larga escala realizada pelo algoritmo CONEXIC. Os genes se encontram ranqueados de acordo com o score obtido nas análises.

Ranqueamento CONEXIC	Símbolo do gene	Nome do gene	ANC	ELE
1	<i>PAPOLB</i>	Poly(A) polymerase beta (testis specific)	+	1,16
2	<i>DPEP2</i>	Dipeptidase 2	+	1,17
3	<i>EMG1</i>	EMG1 N1-specific pseudouridine methyltransferase	+	1,30
4	<i>PMS2L2</i>	Postmeiotic segregation increased 2-like 2 pseudogene	+	1,15
5	<i>CAMK2N2</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2	+	2,16
6	<i>PTMS</i>	Parathymosin	+	1,28
7	<i>MICALL2</i>	MICAL-like 2	+	1,20
8	<i>TUT1</i>	Terminal uridylyl transferase 1, U6 snRNA-specific	+	1,52
9	<i>DUS2L</i>	Dihydrouridine synthase 2	+	1,58
10	<i>NSUN5</i>	NOP2/Sun domain family, member 5	+	1,32
11	<i>WBSR22</i>	Williams Beuren syndrome chromosome region 22	+	1,21
12	<i>UNC93B1</i>	Unc-93 homolog B1 (C. elegans)	+	1,20
13	<i>FAM220A</i>	Family with sequence similarity 220, member A	+	1,22
14	<i>EFEMP2</i>	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	+	1,20
15	<i>CD72</i>	CD72 molecule	+	2,73
16	<i>RHOD</i>	RAS homolog family member D	+	2,23
17	<i>CDCA3</i>	Cell division cycle associated 3	+	2,16
18	<i>EMID2</i>	EMI domain containing 2	+	1,39
19	<i>INTS5</i>	Integrator complex subunit 5	+	1,32
20	<i>CCDC85B</i>	Coiled-coil domain containing 85B	+	1,21
21	<i>CA9</i>	Carbonic anhydrase IX	+	4,82
22	<i>ABCF3</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3	+	1,19
23	<i>LEPREL2</i>	Leprecan-like 2	+	1,43
24	<i>ASB6</i>	Ankyrin repeat and SOCS box containing 6	+	1,20
25	<i>C11orf68</i>	Chromosome 11 open reading frame 68	+	1,48
26	<i>PLXDC2</i>	Plexin domain containing 2	-	-2,20
27	<i>STX1A</i>	Syntaxin 1A (brain)	+	1,32
28	<i>PACS1</i>	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	+	1,21
29	<i>ANO1</i>	Anoctamin 1, calcium activated chloride channel	+	1,34
30	<i>GANAB</i>	Glucosidase, alpha; neutral AB	+	1,29
31	<i>CCDC88B</i>	Coiled-coil domain containing 88B	+	1,17
32	<i>RPP25L</i>	Ribonuclease P/MRP 25kDa subunit-like	+	1,28
33	<i>HINT2</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 2	+	1,27
34	<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi 1	+	1,36
35	<i>C7orf50</i>	Chromosome 7 open reading frame 50	+	2,17
36	<i>SPAG8</i>	Sperm associated antigen 8	+	1,39
37	<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase 1	+	1,56
38	<i>TTC9C</i>	Tetrapeptide repeat domain 9C	+	1,32
39	<i>FBXL18</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 18	+	1,23
40	<i>FANCG</i>	Fanconi anemia, complementation group G	+	2,13
41	<i>MACROD1</i>	MACRO domain containing 1	+	1,16
42	<i>SSSCA1</i>	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1	+	1,17
43	<i>ALG3</i>	ALG3, alpha-1,3- mannosyltransferase	+	1,51
44	<i>ENO2</i>	Enolase 2 (gamma, neuronal)	+	2,60
45	<i>TNRC18</i>	Trinucleotide repeat containing 18	+	1,23
46	<i>GNB3</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3	+	1,23
47	<i>CDK2AP2</i>	Cyclin-dependent kinase 2 associated protein 2	+	1,25

ANC – Variação no número de cópias

ELE – Expressão em larga escala (fold-change)

Todos os 47 genes candidatos a moduladores foram submetidos a avaliação funcional *in silico* e por meio dos softwares Ingenuity Pathways Analysis (IPA) e posteriormente validados no software de livre acesso KOBAS 2.0 (Quadro 3). As avaliações realizadas no IPA demonstraram 3 vias de interação gênicas (“*top networks*”) associadas ao metabolismo de carboidratos, manutenção celular, modificações pós-transcricionais e desenvolvimento de órgãos (Figura 4).

Quadro 3 - Validação da avaliação funcional *in silico* dos 47 genes candidatos a moduladores realizada no software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) pelo software de livre acesso KOBAS 2.0.

Função	Classificação pelo IPA	KOBAS
Glicólise I	Via canônica	Confirmada
Degradação da sacarose V	Via canônica	Confirmada
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide</i> biosíntese	Via canônica	Não confirmada
Leucotrieno biosíntese	Via canônica	Confirmada
Sinalização Gαq	Via canônica	Não confirmada
Morfologia tumoral	Função biológica	Confirmada
Modificação pós-transcricional	Função molecular	Confirmada
Morte celular	Função molecular	Confirmada
Manutenção e funções celulares	Função molecular	Confirmada
Metabolismo de carboidratos	Função molecular/ <i>Top Networks</i>	Confirmada
Manutenção celular	<i>Top networks</i>	Confirmada
Modificação pós-transcricional	<i>Top networks</i>	Confirmada
Desenvolvimento de órgãos	<i>Top networks</i>	Confirmada

Algumas vias canônicas também foram associadas com alguns dos genes caracterizados como possíveis moduladores do carcinoma vulvar como: glicólise I, degradação de sacarose V, biossíntese de *Dolichyl-diphosphooligosaccharide*, a biossíntese dos leucotrienos e sinalização de Gαq. A avaliação das principais funções biológicas associadas aos 47 possíveis moduladores revelou que três genes foram significativamente associados com a morfologia do tumor (*DUS2L*, *GSTP1*, *CA9*). Em relação as funções moleculares *INTS5* e *TUT1* foram associados à modificação pós-transcricional ($p=2,48E-04 - 2,94E-02$); os genes *CA9*, *FANCG* e *GSTP1* foram associados com a morte celular e sobrevivência ($p=9,39E-04 - 4,85E-02$); *CA9*, *FANCG* e *STX1A* à função e manutenção celular ($p=9,39E-04 - 2,36E-02$); a expressão do gene *GNB3* foi associado ao metabolismo de carboidratos ($p=1,98E-03 - 1,98E-03$), e a dos genes *CA9* e *DUS2L*, ligados ao desenvolvimento celular ($p=1,98E-03 - 9,89E-03$).

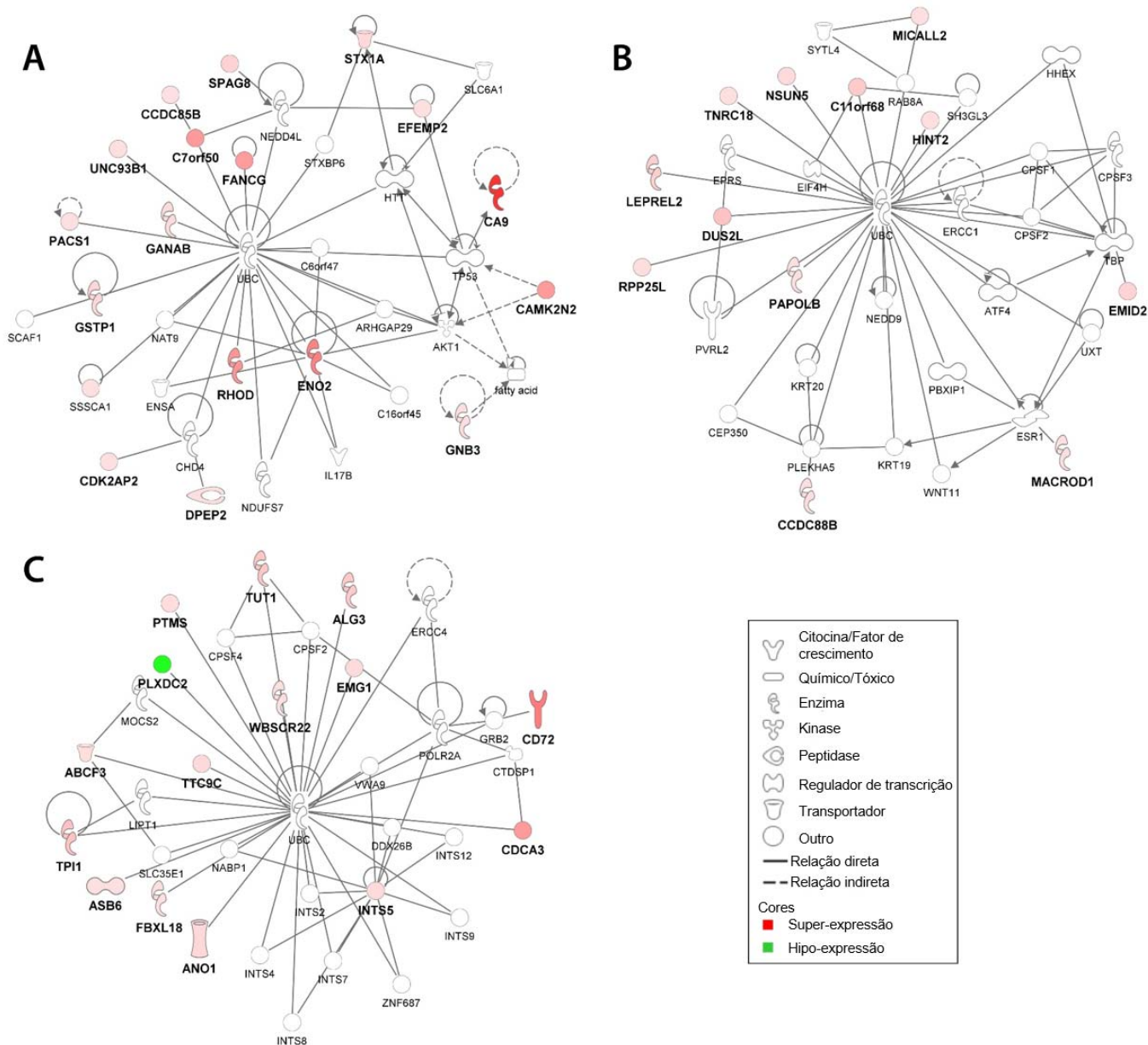


Figura 4 – Principais redes genicas associadas aos genes classificados como possíveis moduladores do carcinoma vulvar (Análise IPA) – Rede 1 (A); Rede 2 (B) e Rede 3 (C)

Os 47 genes selecionados como possíveis drivers também foram submetidos a uma avaliação estatística que os associou as variáveis clínico-patológicas mais relevantes em carcinomas vulvares (**Tabelas 4 e 5**).

Tabela 4 - Associação da expressão dos 47 possíveis moduladores do carcinoma vulvar com diagnóstico histológico, estadiamento FIGO, infecção por HPV, infiltrado inflamatório, invasão perineural e invasão vascular.

Gene	Médias de expressão das variáveis clínico-patológicas																		
	Diagnóstico Histológico			Estadiamento			HPV			Infiltrado Inflamatório			Invasão Perineural			Invasão Vascular			
	1	2	p	FIGO I e II	FIGO III e IV	p	Neg	Pos	P	Leve	Mod	Intenso	P	Neg	Pos	p	Neg	Pos	p
ABCF3	0,172	0,105	0,688	0,250	-0,038	0,191	0,147	0,150	1,000	0,188	0,120	-0,260	0,471	0,285	-0,180	0,114	0,205	0,012	0,461
ALG3	0,739	0,292	0,044	0,632	0,487	0,191	0,716	0,507	0,228	0,314	0,814	0,434	0,044	0,659	0,394	0,206	0,623	0,481	0,292
ANO1	0,136	-0,008	0,841	0,495	-0,665	0,159	1,138	-0,489	0,021	-0,563	0,979	-0,455	0,068	0,184	-0,152	0,598	0,142	-0,051	0,752
ASB6	0,362	0,363	1,000	0,249	0,570	0,366	0,299	0,397	0,482	0,315	0,365	0,378	0,866	0,340	0,417	0,673	0,323	0,457	0,916
C11orf68	0,471	0,484	0,841	0,557	0,327	0,366	0,569	0,425	0,482	0,479	0,509	0,213	0,766	0,565	0,262	0,073	0,478	0,470	0,752
C7orf50	1,057	1,174	0,366	1,098	1,100	1,000	1,318	0,979	0,132	0,874	1,366	1,104	0,120	1,044	1,229	0,752	0,985	1,372	0,292
C7orf70	0,248	0,380	0,546	0,187	0,494	0,269	0,488	0,190	0,421	0,141	0,561	0,390	0,629	0,135	0,678	0,073	0,177	0,578	0,246
C9orf23	0,173	0,112	0,688	0,110	0,228	0,841	-0,175	0,329	0,132	0,150	0,165	0,242	0,951	0,205	0,022	0,292	0,241	-0,064	0,206
CA9	1,412	2,077	0,191	1,293	2,295	0,315	1,221	1,879	0,546	1,836	2,053	1,738	0,944	1,514	1,966	0,752	1,287	2,510	0,171
CAMK2N2	0,895	1,669	0,088	0,978	1,517	0,191	1,193	1,155	0,841	1,223	1,558	0,695	0,390	1,234	1,010	0,673	1,004	1,563	0,246
CCDC85B	0,322	0,213	0,615	0,523	-0,155	0,007	0,473	0,180	0,228	0,189	0,353	0,215	0,568	0,387	0,034	0,206	0,375	0,063	0,292
CCDC88B	0,403	0,054	0,546	0,831	-0,733	0,021	0,499	0,160	0,615	0,733	0,265	0,202	0,669	0,617	0,162	0,246	0,550	0,322	0,598
CD72	0,989	1,992	0,070	1,092	1,803	0,228	0,763	1,659	0,132	1,824	0,410	1,888	0,052	1,418	1,163	0,527	1,338	1,355	1,000
CDCA3	1,039	1,182	0,315	0,914	1,411	0,132	1,019	1,128	0,366	0,915	1,374	0,978	0,333	1,103	1,058	0,752	1,020	1,256	0,527
CDK2AP2	0,344	0,379	0,841	0,526	0,046	0,070	0,607	0,220	0,159	0,431	0,361	0,128	0,931	0,479	0,062	0,171	0,349	0,374	0,752
DPEP2	0,067	0,139	1,000	0,264	-0,222	0,228	0,122	0,076	0,841	0,200	-0,100	0,580	0,418	0,158	-0,066	0,461	0,131	0,000	0,752
DUS2L	0,500	0,021	0,615	0,368	0,262	0,920	0,236	0,382	0,421	-0,055	0,615	0,569	0,944	0,290	0,428	0,916	0,468	0,003	0,343
EFEMP2	0,329	0,337	0,920	0,389	0,228	0,763	0,604	0,184	0,315	0,610	0,072	0,162	0,699	0,357	0,271	0,833	0,230	0,576	0,527
EMG1	0,471	0,423	0,920	0,253	0,821	0,191	0,266	0,556	0,546	0,118	0,827	0,732	0,292	0,231	0,989	0,140	0,400	0,583	0,833
EMID2	0,272	0,461	0,366	0,318	0,378	0,841	0,469	0,268	0,366	0,275	0,515	0,284	0,568	0,299	0,435	0,461	0,383	0,234	0,673
ENO2	0,975	2,073	0,056	1,490	1,128	0,688	1,725	1,164	0,421	1,549	1,967	-0,221	0,069	1,596	0,800	0,527	1,101	1,989	0,292
FANCG	0,540	1,376	0,070	0,606	1,256	0,228	0,325	1,114	0,132	1,169	0,814	0,175	0,349	1,034	0,357	0,206	0,785	0,957	0,833
FBXL18	0,180	0,192	0,841	0,209	0,138	0,841	0,370	0,082	0,546	0,123	0,564	-0,542	0,147	0,236	0,059	0,833	0,115	0,351	0,598
GANAB	0,265	0,403	0,763	0,398	0,158	0,841	0,525	0,198	0,366	0,342	0,347	-0,172	0,563	0,441	0,008	0,246	0,292	0,365	0,673
GNB3	0,371	0,258	0,421	0,339	0,317	0,688	0,335	0,330	1,000	0,265	0,456	0,321	0,292	0,329	0,338	0,598	0,239	0,553	0,045
GSTP1	0,619	-0,309	0,070	0,425	0,048	0,546	0,816	0,006	0,132	-0,188	0,708	0,494	0,120	0,321	0,221	0,673	0,351	0,149	0,598
HINT2	0,007	0,574	0,070	0,004	0,580	0,132	-0,394	0,535	0,035	0,231	0,333	0,001	0,766	0,258	0,084	0,598	0,216	0,186	1,000

Cont/ Tabela 4

Gene	Médias de expressão das variáveis clinico-patológicas																			
	Diagnóstico Histológico			Estadiamento			HPV			Infiltrado Inflamatório			Invasão Perineural			Invasão Vascular				
	1	2	p	FIGO I e II	FIGO III e IV	p	Neg	Pos	p	Leve	Mod	Intenso	P	Neg	Pos	p	Neg	Pos	p	
INTS5	0,319	-0,060	0,615	0,281	0,011	0,688	0,550	-0,013	0,366	0,004	0,463	-0,260	0,741	0,293	-0,072	0,171	0,314	-0,123	0,140	
LEPREL2	0,365	0,680	0,315	0,458	0,510	0,841	0,896	0,248	0,088	0,570	0,612	0,170	0,714	0,390	0,684	0,461	0,240	1,044	0,073	
MACROD1	0,046	0,331	0,546	0,112	0,210	0,688	-0,002	0,227	0,482	0,234	-0,041	0,275	0,553	0,188	0,047	0,673	0,166	0,101	0,833	
MICALL2	0,187	0,510	0,366	0,474	-0,015	0,044	0,845	0,005	0,003	0,349	0,549	-0,315	0,245	0,387	0,096	0,343	0,286	0,339	1,000	
NSUN5	0,199	0,833	0,012	0,341	0,574	0,315	0,286	0,498	0,366	0,531	0,609	-0,183	0,153	0,492	0,257	0,343	0,352	0,594	0,527	
PACS1	0,253	0,213	0,763	0,343	0,048	0,132	0,383	0,160	0,228	0,247	0,197	0,205	0,946	0,331	0,016	0,140	0,283	0,134	0,527	
PAPOLB	0,328	0,168	0,132	0,331	0,161	0,159	0,223	0,298	1,000	0,151	0,457	0,316	0,122	0,334	0,120	0,171	0,343	0,099	0,045	
PLXDC2	-1,511	-0,863	0,108	-	1,431	-1,010	0,191	-1,113	-1,375	0,688	-1,294	-1,321	-1,009	0,793	-1,281	-1,286	1,000	-1,276	-1,298	0,916
PMS2L2	0,279	0,439	0,615	0,294	0,410	0,688	0,301	0,353	0,920	0,252	0,402	0,469	0,931	0,244	0,553	0,246	0,243	0,557	0,206	
PTMS	0,210	0,344	0,688	0,392	0,011	0,315	0,293	0,238	0,920	0,373	0,228	-0,034	0,969	0,428	-0,153	0,073	0,275	0,216	0,673	
RHOD	1,316	-0,872	0,005	0,826	0,027	0,159	1,035	0,276	0,366	-0,385	1,047	1,818	0,057	0,325	1,068	0,399	0,622	0,355	0,752	
SPAG8	0,392	0,791	0,228	0,459	0,668	0,421	0,253	0,686	0,088	0,984	0,289	0,266	0,029	0,504	0,602	0,673	0,446	0,743	0,292	
SSSCA1	0,549	0,142	0,044	0,535	0,167	0,132	0,508	0,349	0,920	0,152	0,517	0,959	0,130	0,351	0,535	0,399	0,451	0,295	0,461	
STX1A	0,933	0,676	0,191	0,900	0,735	0,191	1,102	0,700	0,035	0,714	1,047	0,782	0,273	0,827	0,879	0,833	0,847	0,829	0,527	
TNRC18	0,735	1,047	0,688	0,962	0,630	0,920	0,592	0,982	0,920	1,068	0,119	1,431	0,544	1,091	0,253	0,292	0,947	0,600	0,833	
TP11	0,343	0,583	0,688	0,378	0,520	0,763	0,431	0,426	0,841	0,367	0,997	-0,423	0,015	0,445	0,386	0,916	0,309	0,713	0,399	
TTC9C	0,604	0,519	0,546	0,554	0,610	0,841	0,538	0,593	0,688	0,591	0,580	0,759	0,743	0,507	0,734	0,171	0,559	0,611	0,673	
TUT1	0,355	0,832	0,056	0,580	0,419	0,920	0,567	0,499	1,000	0,582	0,630	0,138	0,560	0,598	0,344	0,833	0,474	0,642	0,399	
UNC93B1	0,483	0,724	0,315	0,699	0,329	0,016	0,493	0,609	0,920	0,598	0,640	0,415	0,568	0,720	0,203	0,003	0,682	0,294	0,020	
WBSCR22	0,153	0,519	0,021	0,230	0,377	0,366	0,279	0,284	0,920	0,270	0,400	0,115	0,385	0,285	0,274	0,833	0,252	0,355	0,527	

1 – CEC1 e 2; 2 – CEC3 e basalóide; Pos – positivo; Neg – Negativo; Mod - Moderado

Tabela 5 - Associação da expressão dos 47 possíveis moduladores do carcinoma vulvar com metástase linfonodal profundidade de invasão e recidiva.

Gene	Médias de expressão das variáveis clinico-patológicas								
	Metástase Linfonodal			Profundidade de invasão			Recidiva		
	Ausente	Presente	p	Superficial	Profunda	p	Ausente	Presente	p
ABCF3	0,272	-0,156	0,165	0,175	0,139	0,888	0,203	0,220	0,794
ALG3	0,690	0,477	0,355	0,440	0,738	0,480	0,736	0,320	0,151
ANO1	0,412	-0,169	0,643	-0,394	0,328	0,480	0,333	-0,448	0,296
ASB6	0,364	0,457	0,758	0,264	0,468	0,671	0,533	0,116	0,296
C11orf68	0,442	0,441	0,758	0,587	0,486	0,671	0,531	0,515	0,695
C7orf50	1,019	1,598	0,090	0,777	1,265	0,258	1,173	0,867	0,514
C7orf70	0,288	0,553	0,537	0,053	0,398	0,258	0,307	0,307	0,794
C9orf23	0,137	-0,115	0,355	0,449	0,090	0,203	0,227	-0,228	0,192
CA9	1,342	2,571	0,217	1,408	2,145	0,396	1,924	0,672	0,192
CAMK2N2	0,900	1,815	0,090	1,126	1,567	0,157	1,383	0,964	0,296
CCDC85B	0,315	-0,080	0,123	0,576	0,154	0,258	0,292	0,338	1,000
CCDC88B	0,295	-0,313	0,355	0,836	-0,119	0,322	0,450	1,250	0,240
CD72	1,256	1,376	0,758	1,505	1,152	0,671	0,956	2,302	0,068
CDCA3	1,083	1,543	0,280	0,651	1,430	0,066	1,248	0,666	0,240
CDK2AP2	0,221	0,431	0,280	0,588	0,394	0,120	0,458	0,422	1,000
DPEP2	0,033	-0,058	0,877	0,376	-0,052	0,480	-0,136	0,702	0,068
DUS2L	0,821	-0,356	0,021	-0,085	0,408	0,480	0,301	0,136	0,794
EFEMP2	-0,027	0,787	0,123	0,683	0,233	0,572	0,272	0,817	0,240
EMG1	0,587	0,664	0,877	-0,055	0,606	0,258	0,390	0,141	0,695
EMID2	0,455	0,275	0,440	0,141	0,445	0,203	0,367	0,320	1,000
ENO2	0,949	2,271	0,123	1,382	1,765	0,671	1,723	1,160	0,296
FANCG	0,548	1,194	0,217	1,123	0,969	0,888	1,022	0,434	0,433
FBXL18	0,091	-0,306	0,217	0,217	0,275	0,777	0,331	0,088	0,433
GANAB	0,300	0,266	0,877	0,392	0,280	0,671	0,457	0,158	0,192
GNB3	0,271	0,645	0,031	0,153	0,499	0,090	0,423	0,181	0,296
GSTP1	0,455	0,171	1,000	0,045	0,514	1,000	0,503	-0,129	0,514
HINT2	0,105	0,286	0,537	0,358	0,202	0,777	0,200	-0,117	0,514
INTS5	0,436	-0,253	0,064	0,060	0,299	0,777	0,337	0,138	1,000
LEPREL2	0,143	1,176	0,021	0,528	0,483	0,888	0,439	0,935	0,361
MACROD1	0,328	-0,062	0,280	-0,054	0,228	0,396	0,349	-0,274	0,068
MICALL2	0,187	0,414	0,643	0,445	0,278	0,777	0,330	0,468	1,000

Cont/ Tabela 5

Gene	Médias de expressão das variáveis clinico-patológicas								
	Metástase Linfonodal			Profundidade de invasão			Recidiva		
	Ausente	Presente	p	Superficial	Profunda	p	Ausente	Presente	p
NSUN5	0,309	0,606	0,440	0,496	0,508	0,888	0,485	0,421	0,695
PACS1	0,302	-0,013	0,217	0,348	0,179	0,572	0,277	0,261	0,896
PAPOLB	0,208	0,162	0,280	0,523	0,243	0,396	0,210	0,187	0,794
PLXDC2	-1,308	-1,098	0,537	-1,411	-1,257	0,888	-1,532	-0,505	0,009
PMS2L2	0,332	0,345	0,877	-0,506	0,538	0,011	0,389	-0,091	0,151
PTMS	0,042	0,327	0,758	0,672	0,254	0,572	0,239	0,650	0,602
RHOD	1,004	0,034	0,355	0,019	0,577	0,671	0,618	-0,369	0,240
SPAG8	0,477	0,670	0,537	0,522	0,552	0,888	0,486	0,805	0,433
SSSCA1	0,582	0,155	0,064	0,257	0,395	0,396	0,387	0,240	0,361
STX1A	0,847	0,844	0,643	0,829	0,820	0,888	0,900	0,540	0,151
TNRC18	0,177	0,371	0,877	1,524	0,602	0,396	0,551	1,880	0,117
TPI1	0,353	0,791	0,355	0,233	0,697	0,258	0,536	0,265	0,514
TTC9C	0,486	0,627	0,537	0,718	0,513	0,157	0,556	0,459	0,433
TUT1	0,636	0,528	0,537	0,265	0,697	0,066	0,688	0,550	0,514
UNC93B1	0,689	0,353	0,005	0,923	0,487	0,203	0,495	0,737	0,433
WBSCR22	0,203	0,465	0,165	0,276	0,336	0,777	0,299	0,329	1,000

A partir da avaliação das associações observadas foi possível perceber que entre os 47 genes selecionados somente 19 apresentaram alguma associação com pelo menos uma das variáveis. O gene que mais se sobressaiu nessas associações foi o gene *UNC93B1* que se apresentou alterado significativamente em 4 variáveis. Contudo ele não apareceu em nenhuma das avaliações *in silico* o que nos levou a retirá-lo da lista de possíveis genes a serem validados.

Outros genes como *ALG3*, *CCDC85B*, *GNB3* e *MICALL2* também estiveram presentes em mais de uma associação, contudo dos genes listados acima somente *GNB3* obteve associação com metástase linfonodal

e também apareceu nas avaliações *in silico*. Sendo a metástase linfonodal um dos principais fatores prognósticos em carcinomas vulvares e o potencial desse gene em processos carcinogênicos já avaliados em outros tumores ele foi selecionado para a validação.

Outro gene selecionado para a avaliação foi *PLXDC2*, uma vez que foi o único gene com a diminuição da expressão associada com a perda de cópia genômica além de apresentar expressão do mesmo com associação à recidiva.

5.4 VALIDAÇÕES – QRT-PCR

A avaliação do número de cópias do DNA de *GNB3* e *PLXDC2* por qRT-PCR foi realizada em duas regiões cobertas por sondas presentes nas análises de aCGH. A média da quantificação absoluta de *GNB3* foi de 0,619 e 0,693 (Tabela 9). Na análise de *PLXDC2* uma das sondas avaliada corroborou com a constatação obtida pela técnica de aCGH, com uma perda de número de cópias (0,197) (Tabela 6). A outra sonda avaliada revelou um número de cópia normal (0,616). As associações significativas da quantificação absoluta do número de cópias gênicas com parâmetros clínicos revelaram que o maior número de cópias da primeira sequência testada de *GNB3* está associada à presença de metástase linfonodal ($p=0,03$) e que uma das sondas testadas para o gene *PLXDC2* apresenta maior número de cópias naqueles casos de tumores mais indiferenciados tais como CEC3 e tumores basalóides ($p=0,01$) (Tabela 7).

Tabela 6 - Quantificação relativa e absoluta dos genes *GNB3* e *PLXDC2* pela técnica de RT-PCR em amostras de carcinoma vulvar

		Média	SD
Expressão	<i>GNB3</i> *	2,014	2,8863
	<i>PLXDC2</i> *	0,429	0,5299
Número de cópias	<i>GNB3-1</i> **	0,693	0,3726
	<i>GNB3-2</i> **	0,619	0,225
	<i>PLXDC2-1</i> **	0,197	0,1823
	<i>PLXDC2-2</i> **	0,616	0,3324

*Quantificação relativa (RQ); **Quantificação absoluta

Tabela 7 - Associação entre o número de cópias obtida por meio da técnica de quantificação absoluta e variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney)

Variables	GNB3-1			GNB3-2			PLXDC2-1			PLXDC2-2		
	N	Mean Rank	P	N	Mean Rank	P	N	Mean Rank	P	N	Mean Rank	P
Histologia												
CEC1/2-Verrucoso	6	6.75	0.81	6	7.17	0.52	6	3.92	0.01	6	6.67	0.87
CEC3-Ca Basalóide	6	6.25		6	5.83		6	9.08		6	6.33	
Invasão												
Superficial	4	5.88	0.67	4	7.50	0.49	4	6.38	0.93	4	6.00	0,73
Derme profunda	8	6.81		8	6.00		8	6.56		8	6.75	
Invasão vascular												
Negativa	10	7.40	0.23	10	7.75	0.42	10	7.70	0.38	10	6.80	0,07
Positiva	6	10.33		6	9.75		6	9.83		6	11.33	
Invasão perineural												
Negativa	11	7.23	0.11	11	7.50	0.21	11	8.05	0.57	11	7.23	0,11
Positiva	5	11.30		5	10.70		5	9.50		5	11.30	
Metastase linfonodal												
Negativa	4	2.75	0.03	4	3.50	0.14	4	5.50	0.62	4	4.00	0,33
Positiva	5	6.80		5	6.20		5	4.60		5	5.80	
Infecção por HPV												
Negativa	5	8.90	0.82	5	6.00	0.16	5	6.10	0.17	5	6.10	0,17
Positiva	11	8.32		11	9.64		11	9.59		11	9.59	
Estadiamento FIGO												
I-II	9	6.33	0.08	9	6.28	0.07	9	6.44	0.10	9	6.39	0,09
III-IV	6	10.50		6	10.58		6	10.33		6	10.42	
Recidiva												
Negativa	10	7.45	0.94	10	6.85	0.36	10	6.90	0.39	10	6.90	0,40
Positiva	4	7.63		4	9.13		4	9.00		4	9.00	

CEC – Carcinoma de células escamosas; Ca Basalóide – Carcinoma basalóide

Avaliação da expressão gênica demonstrou uma alta expressão de *GNB3* (RQ=2,014 \pm 2,89) e uma baixa expressão de *PLXDC2* (RQ=0,429 \pm 0,53) (Tabela 9) em comparação com as amostras normais. A associação entre a expressão de ambos os genes com as variáveis clínico-patológicas não demonstrou qualquer significado, nem mesmo com a sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica (Tabela 8).

Tabela 8 - Associação entre a expressão gênica obtida por meio da técnica de qRT-PCR e variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney)

Variables	<i>GNB3</i>			<i>PLXDC2</i>		
	<i>N</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>P</i>
Histologia						
CEC1/2-Verrucoso	7	7.00	1	7	6.57	0.66
CEC3-Ca Basalóide	6	7.00		6	7.50	
Invasão						
Superficial	4	7.25	0.87	4	7.25	0.87
Derme profunda	9	6.89		9	6.89	
Invasão vascular						
Negativa	10	8.20	0.74	10	8.90	0.66
Positiva	6	9.00		6	7.83	
Invasão perineural						
Negativa	12	8.58	0.90	4	9.33	0.22
Positiva	4	8.25		16	6.00	
Metastase linfonodal						
Negativa	5	5.00	0.60	5	5.60	0.91
Positiva	5	6.00		5	5.40	
Infecção por HPV						
Negativa	6	9.33	0.58	6	9.17	0.66
Positiva	10	8.00		10	8.10	
Estadiamento FIGO						
I-II	10	8.20	0.80	10	8.40	0.62
III-IV	5	7.60		5	7.20	
Recidiva						
Negativa	11	7.73	0.69	11	6.82	0.09
Positiva	4	8.75		4	11.25	

CEC – Carcinoma de células escamosas; Ca Basalóide – Carcinoma basalóide

5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação imuno-histoquímica foi avaliada utilizando a metodologia de HScore, previamente utilizada em outro estudo do nosso grupo para avaliar tumores vulvares (RODRIGUES et al. 2013).

Ambas proteínas foram verificadas no citoplasma em todos os tecidos tumorais avaliados, não havendo nenhum caso negativo entre os casos avaliados (Figura 5). Portanto, uma análise com o algoritmo HScore é de grande valia, uma vez que permite distinguir os casos com maior expressão daqueles de menor expressão com maior acurácia.

A proteína GNB3 obteve uma média de expressão de HScore=248,42, variando entre 155,14 e 284,08, e PLXDC2 teve uma média de HScore=220,89, variando entre 159,75 e 267,18.

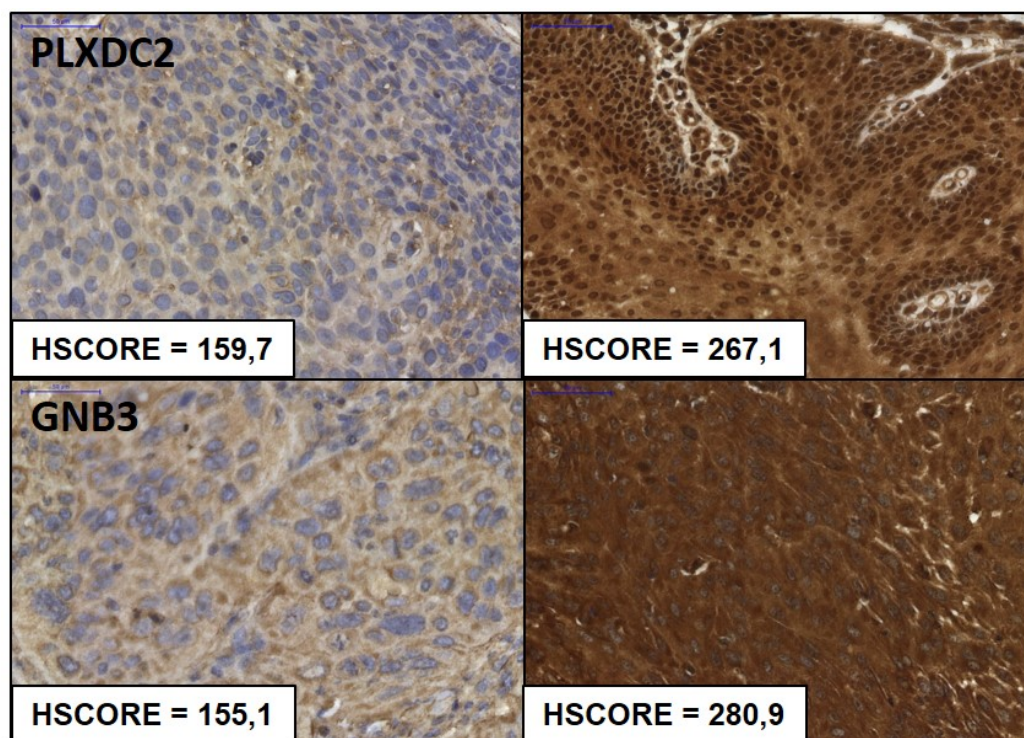


Figura 5 – Padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas PLXDC2 e GNB3 baseado na avaliação por HScore

A análise da proteína GNB3 revelou que a marcação era significativamente maior nos casos caracterizados como grau 1 e 2 ($p=0,01$) e a mesma apresentou uma tendência para uma maior expressão nos casos com ausência de invasão vascular ($p=0,068$) (Tabela 9).

A avaliação de PLXDC2 demonstrou maior expressão dessa proteína naqueles casos com ausência de invasão vascular e perineural ($p=0,011$ e $p=0,032$, respectivamente) (Tabela 10).

Tabela 9 - Associação dos valores da expressão das proteínas PLXDC2 e GNB3 com variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney)

Variables	PLXDC2		GNB3	
	Mean Rank	P	Mean Rank	P
Histologia				
CEC1/2-Verrucoso	38.04	0.46	42.39	0.01*
CEC3-Ca Basalóide	33.83		27.60	
Invasão				
Superficial	44.37	0	42.09	0.09
Derme profunda	26.43		33.56	
Invasão vascular				
Negativa	46.40	0.01*	49.10	0.06
Positiva	29.41		36.53	
Invasão perineural				
Negativa	44.22	0.03*	45.79	0.79
Positiva	27.45		43.77	
Metastase linfonodal				
Negativa	53.67	0.51	57.93	0.61
Positiva	57.94		61.32	
Infecção por HPV				
Negativa	23.77	0.30	29.10	0.24
Positiva	28.10		24.05	
Estadiamento FIGO				
I-II	66.27	0.49	72.48	0.99
III-IV	71.04		72.53	

CEC – Carcinoma de células escamosas; Ca Basalóide – Carcinoma basalóide

A sobrevida câncer específica (SCE) e a sobrevida livre de doença (SLD) de PLXDC2 e GNB3 revelaram melhor prognóstico em relação a SLD para aquelas pacientes que expressaram mais GNB3 ($p=0,033$) e uma tendência para melhor SCE e SLD para aquelas pacientes que foram classificadas com baixa ou moderada expressão de PLXDC2 ($p=0,081$ e $0,072$, respectivamente) (Figura 6).

Considerando-se a relação inversa de expressão de GNB3 e PLXDC2, quando há uma alta expressão de GNB3 concomitante com baixa expressão de PLXDC2 (GNB3^{alta}-PLXDC2^{baixa}) existe uma tendência de melhor prognóstico uma vez que esses casos apresentam baixo número de metástases linfonodais ($p=0,016$) e a maioria deles foram caracterizados com estádios mais precoces, como FIGO I ou II ($p=0,037$) (Tabela 10). A mesma abordagem de agrupamento foi utilizada para avaliar a associação com SCE e SLD. Esta análise demonstrou que o grupo GNB3^{alta}-PLXDC2^{baixa} possui melhor prognóstico, com maiores tempos de SLD ($p=0,005$) (Figura 6).

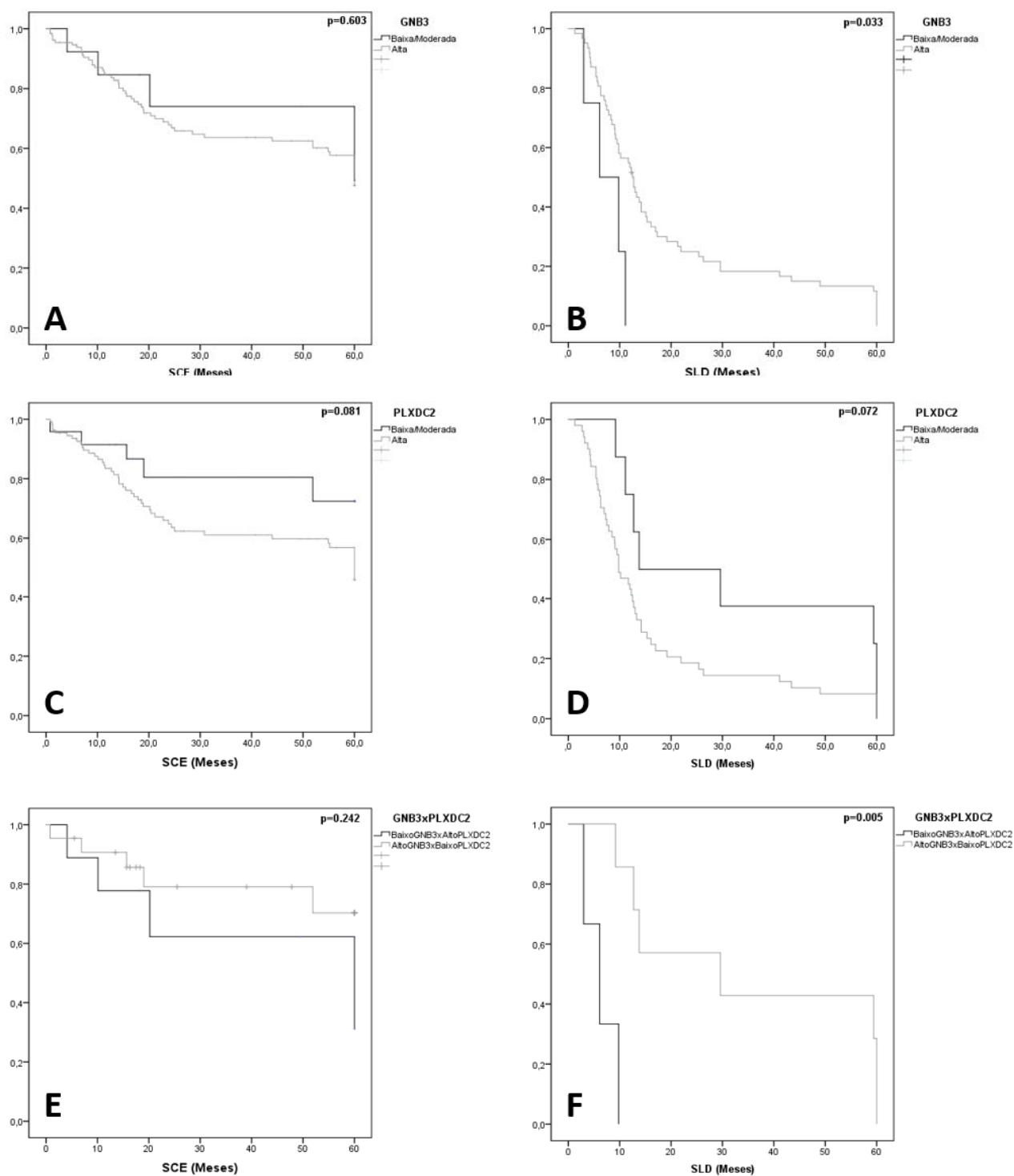


Figura 6 - Sobrevida Cancer Específica (SCE) e Sobrevida Livre de Doença (SLD) associadas à expressão de GNB3 e PLXDC2. A, C e E: SCE de GNB3, PLXDC2 e GNB3xPLXDC2, respectivamente; B, D e F: SLD de GNB3, PLXDC2 e GNB3xPLXDC2, respectivamente

A avaliação dos grupos caracterizados com alta expressão concomitante de GNB3 e PLXDC2 *versus* a baixa expressão de ambas as proteínas não foi possível uma vez que havia apenas dois casos que foram incluídos no grupo de baixa expressão concomitantemente.

Tabela 10 - Associação da expressão inversa de GNB3 e PLXDC2 com variáveis clínico-patológicas em amostras de carcinomas vulvares (Mann-Whitney)

		GNB3 ^{baixa}	x	GNB3 ^{alta}	x	P
		PLXDC2 ^{alta}		PLXDC2 ^{baixa}		
Histologia	CEC 1/2-Verrucoso	4		12		0,858
	CEC3-Ca Basaloide	2		5		
Invasão vascular	Ausente	4		15		0,686
	Presente	2		5		
Invasão perineural	Ausente	5		16		0,856
	Presente	1		4		
Metástase linfonodal	Ausente	4		14		0,016
	Presente	4		1		
Estadiamento FIGO	I-II	4		18		0,037
	III-IV	5		4		
HPV	Negative	1		11		0.272
	Positive	3		6		
Invasão	Derme superficial	4		4		0.131
	Derme profunda	2		13		

CEC – Carcinoma de células escamosas; Ca Basaloide – Carcinoma basaloide

6 DISCUSSÃO

Os casos de tecido a fresco avaliados para as técnicas de aCGH e expressão em larga escala no presente estudo compreenderam em sua maioria casos de carcinoma vulvar de grau 1 ou 2 (66,7%), em estágio precoce (72,2%), positivos para infecção por HPV (66,7%), sem presença de metástase linfonodal (55,6%) e invasão perineural e vascular (72,2%). Os dados referentes aos dados anatomo-patológicos das amostras de CEC vulvar em estudos que utilizaram as mesmas técnicas ou técnicas semelhantes são escassos, contudo MICCI et al. (2013) em seu trabalho utilizaram uma porcentagem semelhante de tumores bem e moderadamente diferenciados (66,7%) enquanto no estudo de JEE et al. (2001) 90% dos casos selecionados foram de tumores bem diferenciados. Essas variações podem comprometer, em alguns termos as comparações entre os resultados, uma vez que tumores menos diferenciados são sugestivos de menor número de alterações genômicas e/ou transcriptômicas. Os demais dados não foram possíveis de serem resgatados de estudos prévios semelhantes, uma vez que os mesmos não os descreveram ou em alguns casos foram controlados para caracterizar, por exemplo, vias relacionadas ao HPV (HUANG et al. 2001; ALLEN et al. 2002).

Apesar das limitações encontradas em estudos semelhantes o número de tumores que apresentavam metástase nos linfonodos, um importante fator prognóstico para CEC vulvar, se encontra pouco acima de

valores já descritos na literatura que variam de 11-39% (DE MELO MAIA et al. 2013; 32–35). Esse fator, aliado à descrição dos demais dados, confere a esse trabalho uma maior relevância no que concerne esse tipo de tumor uma vez que pode ser transposto para casuísticas semelhantes.

A dificuldade em uniformizar os estudos em carcinomas vulvares provavelmente advém da limitação do número de casos registrados da própria doença que dificultam a concentração de um amplo número amostral que compreenda as diversidades existentes nesse tipo tumoral.

Em relação aos dados genômicos a distribuição das alterações encontradas em estudos prévios em CEC vulvares não é discrepante como se esperaria dada a falta de uniformidade entre técnicas e materiais usados. Entre as alterações mais frequentes e comuns aos trabalhos já publicados estão ganhos em 3q e 8q e perdas em 3p (JEE et al. 2001; ALLEN et al. 2002; RAITANEN et al. 2003; HUANG et al. 2005; MICCI et al. 2013). Essas alterações são comuns a outros trabalhos envolvendo tumores sólidos e são descritas como sítios de alguns genes supressores tumorais e oncogenes que podem ser relevantes na mediação do desenvolvimento e progressão desses tumores (ALBERTSON et al. 2003). Das alterações descritas somente ganhos em 3q foram frequentes na presente casuística (44% dos tumores). Essa diferença pode em parte ser atribuída às diferenças entre a população estudada, ao tipo de material empregado (fresco, parafinado ou cultura celular) e às técnicas de CGH utilizadas, plataformas e suas respectivas análises. Todas essas variantes podem influenciar de alguma forma o resultado final das análises e culminar com o resultado discrepante

obtido. Outro fator que pode ser sugerido como possível causa para a variação entre a literatura e o presente estudo é a infecção pelo HPV. Segundo ALLEN et al. (2002), que controlaram a avaliação das CNAs por casos infectados ou não por HPV, os ganhos em 8q chegam a estar presentes em 75% das amostras negativas para o vírus. Esse fato é contraposto pelos achados de HUANG et al. (2005) que mesmo apresentando somente 2 casos de HPV negativo entre sua amostragem demonstrou os mesmos 75% de prevalência de ganhos em 8q. Esse fato demonstra que as consequências da infecção pelo HPV são bem mais complexas e podem gerar padrões diferenciados de alterações genômicas, assim como o que foi observado no presente trabalho.

A maior concentração de perdas em relação ao número de ganhos de cópias genômicas é uma observação presente em alguns trabalhos (ALLEN et al. 2002; HUANG et al. 2005; MICCI et al. 2013). Esses achados divergem dos nossos, contudo alguns desses trabalhos utilizaram metodologias baseadas em CGH e amostras bastante discrepantes daquelas que foram utilizadas no presente estudo, como culturas celulares e amostras emblocadas em parafina. Outra possibilidade é a diferença entre os *thresholds* usados para a avaliação que podem ter levado a uma seleção menor de alterações.

Apesar dos avanços ainda são incertos os mecanismos pelos quais as CNAs contribuem para a tumorigênese e progressão tumoral, contudo existe um forte indício de que essas alterações estejam associadas a desregulações na expressão gênica como aumento ou diminuição da

expressão dos genes contidos nas regiões de CNAs (MICCI et al. 2013). Portanto, foram realizadas avaliações de expressão em uma plataforma de larga escala das mesmas amostras usadas para a técnica de aCGH.

A expressão em larga escala teve como propósito a integração dos dados genômicos e transcriptômicos, contudo a comparação com o único trabalho disponível em carcinomas vulvares demonstrou que nossas análises apresentaram um número muito superior de genes diferencialmente expressos, 7951 contra 580 (MICCI et al. 2013). Contudo é importante ressaltar que as plataformas utilizadas foram completamente distintas a avaliação das mesmas também seguiu, em partes, métodos diferenciados. Dessa forma o número de genes encontrados não foi compatível, tampouco os genes diferencialmente expressos em cada uma delas.

Na presente análise, *DCD* (dermcidin) e *AMTN* (amelotin) foram selecionados como sendo os genes com diminuição e aumento de expressão, respectivamente. O primeiro, apesar de ter demonstrado com notável diminuição nos nossos casos, apresenta-se como um oncogene, tendo sido associado com progressão e manutenção das células tumorais em estudos envolvendo tumores de mama e próstata (STEWART et al. 2007; BRAUER et al. 2014). O gene *AMTN* por sua vez nunca fora associado a processos tumorais que não estivessem relacionado à região oral e mesmo nessas regiões, a sua expressão foi utilizada como um marcador de matriz de esmalte dentário (REN et al. 2012). Pela ausência de registros em carcinomas vulvares ou tumores epiteliais sugerimos que o aumento da expressão desse gene se deva à um reflexo da alteração

generalizada promovida por processos tumorais no tocante à expressão gênica.

Outro achado interessante associado à expressão em larga escala foi a segregação em *clusters* obtida a partir da associação dos genes diferencialmente expressos com as variáveis anatomopatológicas. Essas análises demonstraram com poucas exceções (infecção por HPV, invasão vascular e metástase linfonodal) que existem diferenças na expressão dos CEC vulvares que são capazes de segregar grupos de maior e menor risco para um pior prognóstico.

Apesar de separadamente os dados genômicos e transcriptômicos serem substanciais para a avaliação dos carcinomas vulvares e de outros cânceres, os tumores possuem grande variabilidade entre si e cada um abriga grande quantidade de alterações genéticas das quais somente algumas realmente tem a capacidade de modular o desenvolvimento, proliferação, diferenciação e metástase (AKAVIA et al. 2010). Desse modo, identificar aquelas alterações que modulam os tumores e conferem a eles vantagens adaptativas se faz muito mais relevante do que demonstrar aquelas que são reflexo das alterações moduladoras.

Nesse contexto o presente trabalho integrou os dados de aCGH e expressão em larga escala de 17 amostras de CEC vulvares utilizando o algoritmo “*Copy number and expression in cancer*” (CONEXIC) proposto por AKAVIA et al. (2010) que leva em consideração a frequência de CNAs nos diversos tumores a associa os genes contidos nelas com módulos de genes baseados na expressão gênica. Essas associações são feitas com diversos

genes e módulos com o propósito de identificar aqueles genes que possuem maior capacidade de modular a expressão de outros. Desse modo a variabilidade existente entre os tumores é minimizada e somente aqueles genes com potencial de modulação são selecionados (AKAVIA et al. 2010).

O único trabalho já publicado em CEC vulvar que realiza a integração de dados genômicos e transcriptômicos o fez por meio da seleção de CNAs baseado na frequência de observações nas amostras seguida pela avaliação dos genes incluídos nessas regiões por meio dos dados de expressão (MICCI et al. 2013). Essa metodologia, apesar de amplamente utilizada é sujeita a limitações como o fato das CNAs geralmente serem demasiadamente grandes e abrigarem uma série de genes o que dificulta a seleção de possíveis moduladores e também o fato das CNAs selecionadas baseadas na frequência serem em alguns casos pouco elucidativas no que concerne a função e impacto na fisiopatologia (AKAVIA et al. 2010). Sendo assim o uso do algoritmo CONEXIC confere a esse trabalho um caráter único e relevante no campo da avaliação de CEC vulvar.

As análises integradas dos 17 CEC vulvares apresentaram 47 genes classificados como possíveis moduladores, sendo 46 deles genes que apresentaram ganhos de cópias genômicas associados a aumento da sua expressão e somente um contendo perda de expressão concomitante à perda de cópias do mesmo. O preponderante número de ganhos comparado ao de perdas é corroborado em duas avaliações independentes envolvendo tumores de mama femininos que avaliaram possíveis moduladores por meio da mesma metodologia de avaliação (CIRILO et al. 2013; JOHANSSON et

al. 2013), contudo em um deles em que tumores de mama masculino também foram avaliados o número de genes envolvidos em regiões de perdas concomitantes à diminuição de expressão foi ligeiramente maior que aqueles moduladores envolvidos em regiões de ganho de cópias e expressão (JOHANSSON et al. 2013). Portanto, esses trabalhos demonstram a variabilidade tumoral e a capacidade da metodologia de identificar quaisquer tipos de alterações pertinentes a intensão do presente projeto.

Seguida à seleção dos prováveis moduladores os genes selecionados foram submetidos a análises *in silico* que revelaram as interações gênicas e as funções associadas a eles tais quais vias relacionadas à proliferação, transformação celular, reparo ao DNA, apoptose, diferenciação celular e câncer, fatos que corroboram a escolha dos mesmos como possíveis moduladores do carcinoma vulvar. A partir da avaliação dos resultados das avaliações *in silico* associados a revisão de literatura o gene *GNB3* foi selecionado para validação tendo em vista sua associação com processos de metabolismo de carboidratos, processo essencial para o crescimento, manutenção e proliferação celular. Outro fator preponderante na sua escolha foi sua associação prévia com outros processos tumorais e a ausência de associação já relatada em carcinomas vulvares. O outro gene selecionado foi *PLXDC2* por ter sido o único a apresentar-se com perda de cópia gênica associada à diminuição de expressão.

O gene *PLXDC2* também conhecido como *TEM7R* (*tumor endothelial marker 7-related*) está localizado na posição 10p12.31 e possui um gene

relacionado conhecido como *PLXDC1*, que inicialmente fora chamado de *TEM7* (MILLER-DELANEY et al. 2011). Em estudos anteriores o gene *PLXDC2* geralmente apresenta-se, assim como seu gene relacionado, com aumento de expressão em células endoteliais em ambientes tumorais como em tumores colorretais, contudo ele não aparenta apresentar a mesma associação com o desenvolvimento dessas células como *PLXC1* (MILLER-DELANEY et al. 2011). Apesar do aumento do interesse desse gene em processos tumorais sua real função e as possíveis associações com outras proteínas ainda não foram esclarecidas, tornando-o um excelente alvo para novas avaliações. A partir de estudos prévios é sabido que a expressão de *PLXDC2* está associada com metástase linfonodal e pior prognóstico em tumores de mama (DAVIES et al. 2004) e também participa de processos tais quais apoptose e interrupção do ciclo celular (SCHWARZE et al. 2005).

A expressão gênica de *PLXDC2* não apresentou associação com nenhuma das variáveis clínico-patológicas avaliadas, contudo a avaliação proteica revelou que sua expressão está associada a menores taxas de invasão vascular e perineural. A partir desse achado seria prudente associar a sua expressão como um possível fator de bom prognóstico, contudo a associação da sua expressão com a diminuição de *GNB3* levam à metástase linfonodal, um dos principais fatores de mau prognóstico em carcinomas vulvares (COULTER e GLEASON 2003). Outros fatores relevantes que destoam dos achados da avaliação proteica de *PLXDC2* isoladamente porém corroboram com a avaliação conjunta com *GNB3* são sua associação com estádios tumorais mais precoces e maiores tempos de

sobrevida livre de doença. Esses fatos demonstram que apesar de ser considerado como um possível modulador do CEC vulvar *PLXDC2* não atua de forma independente e mesmo que não estejam diretamente relacionados em vias de expressão a associação entre os níveis de *PLXDC2* e *GNB3* possuem maior impacto sobre o prognóstico que sua avaliação separadamente.

O gene *GNB3* (*guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3*) se encontra na posição chr12p13 e assim como *PLXDC2* esse é o primeiro trabalho a descreve-lo em análises integradas, sendo *GNB3* encontrado com ganhos de cópias genômicas associado a aumento da expressão gênica. O limitado número de trabalhos publicados até o presente momento acerca desse gene não aprecia a expressão do gene ou de sua proteína e sim de uma variante (*Gβ3s*) contendo um polimorfismo (C825T) que atua aumentando sua capacidade de transdutor de sinal por meio da sua atuação como proteína G (SIFERT 2003; EL HINDY et al 2010). Não foi possível determinar o *status* do gene *GNB3* e se ele abriga ou não o polimorfismo *Gβ3s* nas amostras avaliadas de CEC vulvar. Tampouco se o ganho genômico associado ao aumento da expressão é associável ao aumento da sua atividade transdutora de sinais, portanto estudos mais aprofundados se fazem necessários nesse sentido para revelar a natureza e as associações desse gene nesse grupo de tumores.

Nos casos avaliados a expressão do gene *GNB3* não apresentou associação com nenhuma variável clinico-patológica, contudo a avaliação proteica revelou que a maior expressão desse gene estava associada a

tumores mais diferenciados e também possuíam uma menor tendência a apresentarem invasão vascular. Fato que é corroborado pela maior sobrevida livre de doença associada à expressão dessa proteína isoladamente e associada à diminuição de PLXDC2. Esses achados sugerem que GNB3 possa vir a ser usado como um marcador de bom prognóstico em CEC vulvar. Em outros tumores já avaliados ele possui um papel ainda controverso, atuando como fator de bom prognóstico na redução de metástases ósseas em pacientes com câncer de mama (CLAR et al 2008) e aumentando a sobrevida de pacientes portadores de glioblastoma (EL HINDY et al. 2010) e por outro lado como indicador de pior prognóstico para os pacientes de tumores de cabeça e pescoço que abrigam esse polimorfismo (LEHNERDT et al. 2008).

Em carcinomas vulvares não existem registros da sua avaliação, portanto, assim como para a avaliação de *PLXDC2* e o emprego da metodologia de seleção dos mesmos esse trabalho demonstrou novas abordagens e podem ser úteis na compreensão cada vez melhor do carcinoma vulvar, que além de ser um tumor raro e, portanto, possuir limitações no seu estudo, é portador uma complexidade ímpar.

7 CONCLUSÕES

A avaliação por aCGH revelou 28 regiões significativamente alteradas sendo mais frequente ganhos genômicos (22 regiões) do que perdas (6 regiões). Das regiões com ganhos as alterações mais frequente foram observadas em 3q27.1, 3q27.2-q27.3, e 19p13.2 enquanto a região de perda mais frequente foi 3p11.1-q11.1.

A técnica de expressão em larga escala demonstrou um número elevado de genes diferencialmente expressos após processos de normalização e análises estatísticas: 7951 genes. Destes 3842 foram considerados com ganho de expressão e 4109 com perda de expressão. O gene mais expresso foi o gene *AMTN* e o menos expresso *DCD*.

A avaliação integrada dos dados de aCGH e expressão em larga escala selecionou 47 genes dos quais 46 foram classificados contendo ganhos de cópias genômicas associado a um aumento de expressão gênica e um apresentou-se contendo diminuição de expressão concomitante a perda genômica.

Os genes *GNB3* e *PLXDC2* foram selecionados para avaliação e a sua expressão gênica fora validade pela técnica de qRT-PCR.

A análise proteica de *PLXDC2* isoladamente demonstrou pouco valor prognóstico enquanto a mesma análise para a expressão proteína *GNB3* revelou que a alta expressão da mesma está associada a tumores mais diferenciados e maiores tempos de sobrevida livre de doença. Contudo, a

avaliação conjunta das duas proteínas demonstrou maior poder de segregação entre os grupos de melhor e pior prognósticos uma vez que a baixa expressão de PLXDC2 concomitante a alta expressão de GNB3 associaram-se a um menor número de metástase linfonodal e maiores tempos de sobrevida livre de doença, demonstrando, portanto, seu potencial para classificação do risco das pacientes portadoras de carcinomas vulvares.

Em conjunto as avaliações feitas nesse trabalho representam um grande avanço no que concerne o carcinoma vulvar uma vez que pela primeira vez uma análise integrada robusta e estatisticamente validade foi realizada. A partir dessas análises também foi possível selecionar dois genes e suas respectivas proteínas, que apesar de não apresentarem indícios de interagirem no ambiente celular, quando inversamente expressas possuem a capacidade de segregar um grupo de pacientes que possui pior prognóstico, além de uma delas sozinha ser um indicador de metástase linfonodal. Dessa forma, estudos futuros podem fazer uso desses marcadores para validá-los para a prática clínica e inserir o carcinoma vulvar no contexto dos tumores avaliados por expressão proteica para que melhores estratégias terapêuticas possam ser adotadas caso a caso.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akavia UD, Litvin O, Kim J, et al. An integrated approach to uncover drivers of cancer. **Cell** 2010; 143:1005-17.

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

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2016**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>> [2016 jan 14].

Baiocchi G, Cestari FM, Rocha RM, et al. Does the count after inguinofemoral lymphadenectomy in vulvar cancer correlate with outcome?. **Eur J Surg Oncol** 2013a; 39:339-43.

Baiocchi G, Silva Cestari FM, Rocha RM, et al. Prognostic value of the number and laterality of metastatic inguinal lymph nodes in vulvar cancer: revisiting the FIGO staging system. **Eur J Surg Oncol** 2013b; 39:780-5.

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

Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling the false discovery rate-a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc Ser B Stat Methodol** 1995; 57:289-300.

Brauer HA, D'Arcy M, Libby TE, et al. Dermcidin expression is associated with disease progression and survival among breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 144:299-306.

Bryndorf T, Kirchhoff M, Larsen J, et al. The most common chromosome aberration detected by high-resolution comparative genomic hybridization in vulvar intraepithelial neoplasia is not seen in vulvar squamous cell carcinoma. **Cytogenet Genome Res** 2004; 106:43-8.

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.

Cifola I, Spinelli R, Beltrame L, et al. Genome-wide screening of copy number alterations and LOH events in renal cell carcinomas and integration with gene expression profile. **Mol Cancer** 2008; 7:6.

Cirilo PD, Marchi FA, Barros Filho Mde C, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals potential targets associated with cell proliferation in uterine leiomyomas. **PLoS One** 2013; 8:e57901.

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

Clar H, Langsenlehner U, Krippel P, et al. A polymorphism in the G protein beta3-subunit gene is associated with bone metastasis risk in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 111:449-52.

Coulter J, Gleason N. Local and regional recurrence of vulval cancer: management dilemmas. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2003; 17:663-81.

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

Davies G, Cunnick GH, Mansel RE, Mason MD, Jiang WG. Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer. **Clin Exp Metastasis** 2004; 21:31-7.

De Hullu JA, Hollema H, Lolkema S, et al. Vulvar carcinoma. The price of less radical surgery. **Cancer** 2002; 95:2331-8.

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.

Denny L, Ngan HYS. Prevention and treatment of HPV associated disease in the HPV vaccine era. Section B: Malignant manifestations of HPV infection - Carcinoma of the cervix, vulva, vagina, anus, and penis. **Int J Gynecol Obstet** 2006; 94(Suppl 1):S50-S55.

Durkin ME, Yuan BZ, Zhou X, et al. DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor. **J Cell Mol Med** 2007; 11:1185-207.

Eifel PJ, Morris M, Burke TW, et al. Prolonged continuous infusion cisplatin and 5-fluorouracil with radiation for locally advanced carcinoma of the vulva. **Gynecol Oncol** 1995; 59:51-6.

El Hindy N, Adamzik M, Lambertz N, et al. Association of the GNB3 825T-allele with better survival in patients with glioblastoma multiforme. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1423-9.

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

Fristachi CE. Câncer de vulva: algumas considerações sobre o tratamento cirúrgico. **Prática Hospitalar** 2004; 6(32):17-9.

Hawthorn L, Luce J, Stein L, Rothschild J. Integration of transcript expression, copy number and LOH analysis of infiltrating ductal carcinoma of the breast. **BMC Cancer** 2010; 10:460.

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** 1991; 164:997-1004.

Hørding U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. **Gynecol Oncol** 1994; 52:241-6.

Huang FY, Kwok YK, Lau ET, Tang MH, Ng TY, Ngan HY. Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 157:42-8.

Hussain S, Madeleine M, Johnson L, et al. Cervical and vulvar cancer risk in relation to joint effects of cigarette smoking and genetic variation in the Interleukin 2. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:1790-9.

Insinga R, Liaw K, Johnson L, et al. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal and vulvar pre-cancers and cancers in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:1611-22.

Jee KJ, Kim YT, Kim KR, Kim HS, Yan A, Knuutila S. Loss in 3p and 4p and gain of 3q are concomitant aberrations in squamous cell carcinoma of the vulva. **Mod Pathol** 2001; 14:377-81

Johansson I, Ringnér M, Hedenfalk I. The landscape of candidate driver genes differs between male and female breast cancer. **PLoS One** 2013; 8:e78299.

Jung SH, Shin SH, Yim SH, Choi HS, Lee SH, Chung YJ. Integrated analysis of copy number alteration and RNA expression profiles of cancer using a high-resolution whole-genome oligonucleotide array. **Exp Mol Med** 2009; 41:462-70.

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

Knopp S, Tropé C, Nesland J, et al. A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. **J Clin Pathol** 2009; 62:212-8.

Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, et al. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 1999; 26:253-7.

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

Kunos C, Simpkins F, Gibbons H, et al. Radiation therapy compared with pelvic node resection for node-positive vulvar cancer: a randomized controlled trial. **Obstet Gynecol** 2009; 114:537-46.

Kumar PP, Good RR, Scott JC. Techniques for management of vulvar cancer by irradiation alone. **Radiat Med** 1988; 6:185-91.

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.

Landoni F, Maneo A, Zanetta G, et al. Concurrent preoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and mitomycin C and radiotherapy (FUMIR) followed by limited surgery in locally advanced and recurrent vulvar carcinoma. **Gynecol Oncol** 1996; 61:321-7.

Lavorato-Rocha AM, de Melo Maia B, Rodrigues IS, et al. Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein. **Ann Surg Oncol** 2013a; 20:31-9.

Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Melo Maia B, et al. Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. **Tumour Biol** 2013b; 34:3713-20.

Lavorato-Rocha AM, Anjos LG, Cunha IW, et al. Immunohistochemical assessment of PTEN in vulvar cancer: best practices for tissue staining, evaluation, and clinical association. **Methods** 2015; 77-78:20-4.

Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, et al. Association study of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism with disease progression an overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:3203-7.

Levenback CF, Ali S, Coleman RL, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in women with squamous cell carcinoma of the vulva: a gynecologic oncology group study. **J Clin Oncol** 2012; 30:3786-91.

Lin JY, Du Beshter B, Angel C, et al. Morbidity and recurrence with modifications of radical vulvectomy and groin dissection. **Gynecol Oncol** 1992; 47:80-6.

[NCI] National Cancer Institute. **Vulvar cancer treatment: for health professionals (PDQ®)**. Available from: <URL:http://www.cancer.gov/types/vulvar/hp/vulvar-treatment-pdq#section/_70> [2016 jan 25].

Macnab JC, Walkinshaw SA, Cordiner JW, et al. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. **N Engl J Med** 1986; 315:1052-8.

Maggino T, Landoni F, Sartori E, et al. Patterns of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the vulva. a multicenter CTF study. **Cancer** 2000; 89:116-22.

Micci F, Panagopoulos I, Haugom L, et al. Genomic aberration patterns and expression profiles of squamous cell carcinomas of the vulva. **Genes Chromosomes Cancer** 2013; 52:551-63.

Michalski B, Mazurek U, Olejek A, et al. [Expression patterns in isoforms of vascular endothelial growth-factors in tissue samples of vulval cancer T1 N2M0 stage]. **Ginekol Pol** 2003; 74:40-7.

Michalski B, Mazurek U, Olejek A, et al. Quantitative RT-PCR assay for mRNA of VEGF and histone H4 in the determination of proliferative and angiogenic activity in vulvar pathology. **Folia Histochem Cytobiol** 2001; 39 Suppl 2:108-9.

Miller-Delaney SF, Lieberam I, Murphy P, Mitchell KJ. Plxdc2 is a mitogen for neural progenitors. **PLoS One** 2011; 6:e14565.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional**. 2010. Disponível em: <URL:<http://www.inca.gov.br/regpop/2003/>> [2015 set 10].

Montana GS, Thomas GM, Moore DH, et al.: Preoperative chemo-radiation for carcinoma of the vulva with N2/N3 nodes: a gynecologic oncology group study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2000; 48:1007-13.

Moore DH, Thomas GM, Montana GS, et al. Preoperative chemoradiation for advanced vulvar cancer: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1998; 42:79-85.

Olejek A, Mazurek U, Kuśmierz D, Michalska A, Wilczok T. [Correlation between the expression of mRNA of histones H2B and H4 and mRNA of kinin receptors B1 and B2 assessed by QRT-PCR in vulvar cancer]. **Ginekol Pol** 2002; 73:897-903.

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

Pinto AP, Lin MC, Mutter GL, Sun D, Villa LL, Crum CP. Allelic loss in human papillomavirus-positive and negative vulvar squamous cell carcinomas. **Am J Pathol** 1999; 154:1009-15.

Piura B, Masotina A, Murdoch J, Lopes A, Morgan P, Monaghan J: Recurrent squamous cell carcinoma of the vulva: a study of 73 cases. **Gynecol Oncol** 1993; 48:189-95.

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

Ren C, Amm HM, DeVilliers P, et al. Targeting the sonic hedgehog pathway in keratocystic odontogenic tumor. **J Biol Chem** 2012; 287:27117-25.

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

Sanchez-Garcia F, Akavia UD, Mozes E, Pe'er D. JISTIC: identification of significant targets in cancer. **BMC Bioinformatics** 2010; 11:189.

Scheiströen M, Tropé C: Combined bleomycin and irradiation in preoperative treatment of advanced squamous cell carcinoma of the vulva. **Acta Oncol** 1993; 32:657-61.

Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrard DF. The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. **Neoplasia** 2005; 7:816-23.

Siffert W. Effects of the G protein beta 3-subunit gene C825T polymorphism: should hypotheses regarding the molecular mechanisms underlying enhanced G protein activation be revised? Focus on "A splice variant of the G protein beta 3-subunit implicated in disease states does not modulate ion channels". **Physiol Genomics** 2003; 13:81-4.

Shylasree TS, Bryant A, Howells RE: Chemoradiation for advanced primary vulval cancer. **Cochrane Database Syst Rev** 2011; 4:CD003752 2011.

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

Stewart GD, Lowrie AG, Riddick AC, Fearon KC, Habib FK, Ross JA. Dermcidin expression confers a survival advantage in prostate cancer cells subjected to oxidative stress or hypoxia. **Prostate** 2007; 67:1308-17.

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.

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

Taussig FJ. Cancer of the vulva: an analysis of 155 cases. **Am J Obstet Gynecol** 1940; 40:764-79.

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

Tsukamoto Y, Uchida T, Karnan S, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. **J Pathol** 2008; 216:471-82.

Van der Zee AG, Oonk MH, Hullu JA, et al. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:884-9.

van Seters M, ten Kate FJ, van Beurden M, et al. In the absence of (early) invasive carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia associated with lichen sclerosis is mainly of undifferentiated type: new insights in histology and aetiology. **J Clin Pathol** 2007; 60:504-9.

Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. **Nucleic Acids Res** 2011; 39:W316-22.

Wang Z, Tropè CG, 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.

Way S. Carcinoma of the vulva. **Am J Obstet Gynecol** 1960; 79:692-7.

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

Worsham MJ, Van Dyke DL, Grenman SE, et al. Consistent chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the vulva. **Genes Chromosomes Cancer** 1991; 3:420-32.

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

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



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 06 de Janeiro de 2012.

Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1623/11
“Avaliação de novos fatores prognósticos em carcinomas vulvares através da integração de dados genômicos e transcriptômicos”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 29/11/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

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

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

Atenciosamente,

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

1/1

Anexo 2 - Quadro referente as características adotadas para estabelecer o estadiamento FIGO atualizado em 2014.

Estadio I	Tumor confinado a vulva.
IA	Lesões ≤2cm, confinadas a vulva com invasão estromal ≤1,0mm sem metástase linfonodal.
IB	lesões >2cm ou com invasão stromal >1,0mm, confinada a vulva sem metastase linfonodal.
Estadio II	Tumor de qualquer tamanho com acometimento de estruturas adjacetes a vulva (terço inferior da uretra e/ou vagina ou anus) sem metastase linfonodal.
Estadio III	Tumor de qualquer tamanho com ou sem acometimento de estruturas adjacetes a vulva (terço inferior da uretra e/ou vagina ou anus) com presença de metastase linfonodal.
IIIA	(i) Com um linfonodo positivo (≥5 mm), ou
	(ii) Com um ou dois linfonodos positivos (<5 mm).
IIIB	(i) Com dois ou mais linfonodos positivos (≥5 mm), ou
	(ii) Com três ou mais linfonodos positivos (<5 mm).
IIIC	Linfonodos positivos com comprometimento extracpsular.
Estadio IV	O tumor invade outras regiões (terço medial da uretra e/ou da vagina), ou estruturas distantes.
IVA	Tumor invade qualquer uma das seguintes regiões:
	(i) Terço superior da uretra e/ou da vagina, bexiga, reto, ou osso pélvico, ou
	(ii) Linfonodos inguinofemorais
IVB	Qualquer metástase linfonodal incluindo linfonodos pélvicos.

Adaptado de FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2014)

An Integrative Approach Uncovers Biomarkers that Associate with Clinically Relevant Disease Outcomes in Vulvar Carcinoma

Andre M. Lavorato-Rocha¹, Erica M. Akagi¹, Beatriz de Melo Maia¹, Iara S. Rodrigues¹, Mayara Caroline Silva Botelho¹, Fabio A. Marchi², Gabriel Fernandes³, Glauco Baiocchi⁴, Fernando A. Soares⁵, Silvia Regina Rogatto², Yukie Sato-Kuwabara⁵, and Rafael M. Rocha¹

Abstract

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) is a rare disease that has a high mortality rate (~40%). However, little is known about its molecular signature. Therefore, an integrated genomics approach, based on comparative genome hybridization (aCGH) and genome-wide expression (GWE) array, was performed to identify driver genes in VSCC. To achieve that, DNA and RNA were extracted from frozen VSCC clinical specimens and examined by aCGH and GWE array, respectively. On the basis of the integration of data using the CONEXIC algorithm, *PLXDC2* and *GNB3* were validated by RT-qPCR. The expression of these genes was then analyzed by IHC in a large set of formalin-fixed paraffin-embedded specimens. These analyses identified 47 putative drivers, 46 of which were characterized by copy number gains that were concomitant with overexpression and one with a copy number loss and downregulation. Two of these

genes, *PLXDC2* and *GNB3*, were selected for further validation: *PLXDC2* was downregulated and *GNB3* was overexpressed compared with non-neoplastic tissue. By IHC, both proteins were ubiquitously expressed throughout vulvar tissue. High expression of *GNB3* and low *PLXDC2* immunostaining in the same sample was significantly associated with less lymph node metastasis and greater disease-free survival. On the basis of a robust methodology never used before for VSCC evaluation, two novel prognostic markers in vulvar cancer are identified: one with favorable prognosis (*GNB3*) and the other with unfavorable prognosis (*PLXDC2*).

Implications: This genomics study reveals markers that associate with prognosis and may provide guidance for better treatment in vulvar cancer. *Mol Cancer Res*; 14(8); 720–9. ©2016 AACR.

Introduction

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) is an uncommon disease, constituting 3% to 5% of all malignancies in the female genital tract (1, 2). VSCC develops primarily in elderly women, after their 70s; however, the number of cases in younger patients has been climbing, likely due to human papillomavirus (HPV) infection (2).

Despite efforts in the last decade to identify the molecular signature of vulvar cancer, few tumor markers have demonstrated clinical value. Most studies have suggested tumor markers for characterization and VSCC prognostication (3–7). Furthermore, *TP53* mutation and *CDKN2A* promoter methylation have been associated with VSCC (8–11).

Wide-coverage methods, such as chromosomal and array comparative genomic hybridization (aCGH), have been used in several studies to better understand VSCC, reporting gains in 3q and 8q and losses in 3p and 8q as recurrent alterations (12–16). Despite these findings, most of these studies used lower-resolution CGH approaches (12–14); two used FFPE samples, which can lead to data misinterpretation (12, 13); and none validated the observed alterations.

Notably, certain genomic alterations do not affect RNA or protein expression (17). Thus, another technique with wide coverage, such as genome-wide expression (GWE) array, is used to identify driver alterations.

Only one study (18) has used a multimodal approach to compare copy number alterations (CNA) and GWE in VSCC. The study was based on the frequency of CNAs to further compare with GWE. This method has several limitations: the size of the region might contain a large number of genes, and this approach alone fails to determine the actual influence of CNA on changes in gene expression (19). Micci and colleagues selected 2 genes, based on recurrent losses on 3p and 9p by aCGH (*FHIT* and *PTPRD*), and 5 genes (*MAL*, *KRT4*, *OLFM4*, *SPRR2G*, and *S100A7A*), based on expression array alterations. However, none of the gene abnormalities was associated with clinical or pathologic variables.

In this study, we examined a carefully selected subset of VSCC by integrating aCGH and GWE data using validated statistical methods to improve our understanding of vulvar cancer. Our integrative analysis identified 47 candidate drivers for VSCC. Two

¹Molecular Morphology Laboratory, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. ²NeoGene Laboratory, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. ³Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil. ⁴Department of Gynecology Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. ⁵Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Rafael M. Rocha, AC Camargo Cancer Center, Rua Antônio Prudente, 440, São Paulo, SP 01508-010, Brazil. Phone: 5511-9855-69336; Fax: 5511-2189-5000; E-mail: rafael.malagoli@gmail.com

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0366

©2016 American Association for Cancer Research.

genes (*PLXDC2* and *GNB3*) were validated and demonstrated a high correlation with the prognosis.

Materials and Methods

Case selection

Seventeen DNA samples of VSCC fresh frozen tissues, with paired RNA (tumoral and adjacent normal tissues), from the Tumor Biobank and 150 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from the Anatomic Pathology Department, AC Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil), were acquired. DNA and RNA of the frozen tissues were used for aCGH, gene expression, and as well for validation. The amount of quality samples did not allow an independent validation. All samples were obtained from patients who underwent surgery at this institution between 1980 and 2008, and none received neoadjuvant therapy. Furthermore, an experienced pathologist in vulvar diseases carefully reviewed all specimens before the molecular and immunohistochemical analysis.

Clinical data were obtained from the medical records of this institution, and this study was approved by the institutional ethics committee (Protocol # 1623/11). HPV was analyzed using the Linear Array HPV Genotyping Test Kit (Roche Molecular Diagnostics), and the entire technique has been detailed by our group (6).

DNA and RNA extraction

Total RNA was extracted from macrodissected frozen tissue.

Briefly, tissue samples were dissected and lysed, and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and a RNeasy spin column per the manufacturer's instructions to increase the yield of the reaction.

The DNA pellets from the tissue lysis step were incubated with Cell Lysis Solution (Gentra Puregene Blood Kit, QIAGEN) for 18 hours in a thermomixer at 55°C. Then, the reactions were centrifuged, and phenol-chloroform-isoamyl alcohol was added. The reactions were centrifuged sequentially with glycogen at 20 mg/mL and 100% and 70% EtOH. The EtOH was removed, and samples were dried and resuspended in distilled water.

After the quality and quantity of the DNA and RNA were measured, samples with high integrity and quality were used for further analysis.

aCGH

A total of 400 ng of tumor DNA and normal commercially available DNA (Promega) was differentially labeled using the Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies). The hybridizations were performed using the SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8 × 60K (Agilent Technologies) as per the manufacturer's recommendations. Acquisition of array images and data evaluation were performed as described by Cirilo and colleagues (2013; ref. 20). CNAs were evaluated prior to data integration by NEXUS copy number software version 5.0 (BioDiscovery). For this analysis, the threshold used was 1×10^{-5} with a minimum of 5 consecutive probes altered. Gains were considered when greater than 0.3; high gain (> 0.8); losses (< -0.3), and homozygous loss those lower than -1.2.

GWE

Gene expression profiles were evaluated using the SurePrint G3 Human GE 8 × 60K Microarray Platform (Agilent Technologies)

as per the manufacturer's protocol. Tumor samples were compared with a pool of 11 adjacent normal tissue samples. The slides were scanned on a DNA microarray scanner with SureScan High-Resolution Technology (Agilent Technologies), and the data were extracted using Feature Extraction v 11.0.1.1 (Agilent Technologies), build 37. TMeV (version 4.8) and R (version 2.15) were used to analyze the gene expression data. Raw data from the array scans were normalized by median-centering of the genes for each array and log₂-transformed. Also, probes with low reproducibility were removed using a filter.

Genomic data were deposited into NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68409>).

Integrative analysis

The genomic and transcriptomic data were integrated to identify driver genes and the processes that they influence. These genes were selected using the CONEXIC algorithm, which combines CNAs and gene expression data and constructs regulatory networks, based on the driver genes that appear (19). Also, the algorithm uses a Bayesian function to detect modulator candidates (drivers) among the regions with amplifications and deletions. The ranked score reflects how well a driver candidate predicts the behavior of a module—higher scores increase the likelihood of a gene having an adaptive advantage on the tumor phenotype. The genes that were selected through the integrative analysis were analyzed with regard to functional enrichment using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, www.qiagen.com/ingenuity).

Quantitative analysis of DNA copy number (qPCR) and gene expression (RT-qPCR)

DNA copy number was measured using two primer pairs that flanked two regions that were covered by aCGH probes for *PLXDC2* and *GNB3*. The primers were designed using OligoTech, version 1.00 (Oligos Etc. Inc.; Therapeutics Inc). Two endogenous genes were used for normalization: *HPRT* and *GAPDH*. The *PLXDC2* and *GNB3* primer sequences and conditions are described in Supplementary File S1.

The reactions were performed in a MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies) on an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Each reaction, performed in triplicate, contained 10 µL Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), 9 µL distilled water, and 0.6 µL each of the forward and reverse primers. Each DNA sequence was quantified and normalized to both endogenous genes. The thresholds for defining a fragment as unaltered (0.5–1.50) and involved in losses (<0.50) and gains (>1.50) were established from the relative copy number values that were obtained in the same control sample for the aCGH.

Gene expression was analyzed by RT-qPCR per the MIQE guidelines (21). cDNA was obtained after reverse transcription of total RNA from tumor and adjacent nontumor samples using the High-Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit (Applied Biosystems). Assays that covered the probes included in SurePrint G3 Human GE 8 × 60K Microarray Platform (Agilent Technologies) for *PLXDC2* and *GNB3* were used for gene expression validation among 2 endogenous genes (*GAPDH* and *HPRT*; Hs00929702_m1, Hs01564088_m1, Hs99999905_m1, Hs02800695_m1, respectively). We used the TaqMan (Applied Biosystems) method as per

the manufacturer's protocol on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The relative quantification was calculated using the model that was proposed by Pfaffl (2001; ref. 22).

IHC

One-hundred and fifty FFPE primary invasive VSCC samples were included in a TMA in duplicate for immunohistochemical analysis, as described in Lavorato-Rocha and colleagues (2015; ref. 23). PLXDC2 was probed with 1 µg/mL polyclonal anti-PLXDC2 (Abnova) using the ADVANCE Kit (DAKO). GNB3 was analyzed using 2.5 µg/mL polyclonal anti-GNB3 (LifeSpan Biosciences) using the Universal LSAB+ Kit/HRP, Rabbit/Mouse/Goat (DAKO).

Antigen retrieval was performed in a pressure cooker for 15 minutes in Tris-EDTA pH 9.0. The reactions were visualized with DAB (3,3'-diaminobenzidine) for 5 minutes and counterstained with hematoxylin for 1 minute. All reactions included positive (tonsil and or skin cancer for PLXDC2 and colorectal cancer for GNB3) and negative (omission of primary antibody) controls. Tumoral adjacent normal tissue was submitted to same protocol of staining regarding PLXDC2 and GNB3. The slides were scanned on a Panoramic 250 Flash II (3DHISTECH Kft), and the stains were quantified using Panoramic Viewer (3DHISTECH Kft) with the DensitoQuant module, which provides an H-Score from 0 to 300. With regard to survival, scores were categorized as having low (1–99), moderate (100–199), and high expression (200–300). Inverse expression patterns of GNB3 and PLXDC2 were compared (i.e., high GNB3/low PLXDC2 vs. low GNB3/high PLXDC2) and low expression was considered when H-Score < 150 for both proteins.

Statistical analysis

Clinical and pathologic variables and qPCR, RT-qPCR, and IHC results were compared by Mann–Whitney test after Kolmogorov–Smirnov test demonstrate that they required a nonparametric approach. χ^2 test was used to compare high GNB3/low PLXDC2 with low GNB3/high PLXDC2 expression with clinical and pathologic data. The Kaplan–Meier method was used to determine survival rates, and log-rank test was used to calculate RR. Statistics analyses were performed using SPSS version 21.0.0.0 (IBM), considering $P \leq 0.05$ as significant.

Results

Sample characterization

Eighteen VSCC samples were examined by aCGH analysis, 66.7% of which were classified as VSCC grade 1 or 2 and 72.2% of which had FIGO stage I or II. Furthermore, 72.2% of patients had no perineural or vascular invasion, and 55.6% had no nodal metastasis. Most subjects were classified as high-risk HPV-positive (66.7%).

CNAs

Two out of 18 samples used for aCGH analysis did not show significant CNAs. The remaining 16 showed a mean of 234 alterations per sample, ranging from 18 to 573. Events of copy number gains were more frequent than losses; however, all the 16 samples had both events concomitantly. Eleven of them exhibited events of high copy number gains and 4 presented homozygous copy loss (Table 1).

Twenty-eight copy numbers were significantly altered: 22 gains, harboring 506 genes, and 6 losses, encompassing 27 genes. The average length of the alterations was 760 kbp.

The frequency of gains and losses varied from 22% to 55% of samples. Gains in 3q27.1, 3q27.2-q27.3, and 19p13.2 were observed in 44% of samples; 38.9% showed gains in 9q33.3-q34.11, 9q34.11, 11q12.3, 11q13.1, 11q13.1-q13.2, 11q13.2, 11q13.3-q13.4, and 16q22.1; 33.3% had gains in 14q24.3; 27.8% had gains in 7p22.3, 7p22.1, 7q11.23, 7q11.23, 7q22.1, 9p13.3, 9p13.3, 12p13.31, and 18q11.2; and 22% had gains in 15q11.1-11.2. Only the region that mapped to 3p11.1-q11.1 experienced a loss in more than half of all samples (55.6%). The regions that mapped to 9p23 and 10p12.31 had losses in 38.9% of samples, and 18q22.1 was lost in 27.8%. Furthermore, 22.2% of samples had deletions in 18p11.21 and 21p11.2. All the gains and losses are available in Supplementary Files S2.

Gene expression alterations

On the basis of the transcriptomic data, 7,951 genes were significantly altered in tumor samples, excluding replicates. Of these genes, 3,842 were overexpressed and 4,109 were downregulated compared with the pool of adjacent normal tissues. The

Table 1. Type and number of significant genomic CNAs per sample performed in the NEXUS software

	HCNG	CNG	CNL	HCNL	CNG/CNL	HCNG/CNG	HCNL/CNL	Total
V07T 2H	5	497	54	0	1	0	0	557
V09T REP 2LAV	0	0	0	0	0	0	0	0
V15T	0	116	6	0	0	0	0	122
V33T	14	39	85	2	0	0	0	140
V34T	0	481	90	2	0	0	0	573
V12T 2H	63	196	97	0	0	8	0	364
V18T 2H	79	162	31	0	0	0	0	272
V22T 2H	12	184	6	0	0	0	0	202
V13T	3	218	11	0	0	0	0	232
V40T	5	27	5	2	0	0	0	39
V21T	0	16	2	0	0	0	0	18
V30T 2LAV	1	52	25	0	0	0	0	78
V39T	4	455	45	2	0	0	1	507
V20T	0	277	17	0	0	0	0	294
V25T	0	61	16	0	0	0	0	77
V24T	0	0	0	0	0	0	0	0
V27T 2H	14	3	93	0	0	0	0	110
V08T	37	62	55	0	1	0	0	155

Abbreviations: CNG, copy number gain; CNL, copy number loss; CNG/CNL, copy number gain and copy number loss in the same region; HCNG, high copy number gain; HCNL, homozygous copy number loss; HCNG/CNG, high copy number gain and copy number gain in the same region; HCNL/CNL, homozygous copy number loss and copy number loss in the same region.

Table 2. Forty-seven genes selected on the basis of integrated analysis of aCGH and GWE by CONEXIC

CONEXIC rank	Gene symbol	Gene name	CNA	GWE
1	<i>PAPOLB</i>	Poly(A) polymerase beta (testis specific)	+	1.16
2	<i>DPEP2</i>	Dipeptidase 2	+	1.17
3	<i>EMG1</i>	EMG1 N1-specific pseudouridine methyltransferase	+	1.30
4	<i>PMS2L2</i>	Postmeiotic segregation increased 2-like 2 pseudogene	+	1.15
5	<i>CAMK2N2</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2	+	2.16
6	<i>PTMS</i>	Parathymosin	+	1.28
7	<i>MICALL2</i>	MICAL-like 2	+	1.20
8	<i>TUT1</i>	Terminal uridylyl transferase 1, U6 snRNA-specific	+	1.52
9	<i>DUS2L</i>	Dihydrouridine synthase 2	+	1.58
10	<i>NSUN5</i>	NOP2/Sun domain family, member 5	+	1.32
11	<i>WBSR22</i>	Williams Beuren syndrome chromosome region 22	+	1.21
12	<i>UNC93B1</i>	Unc-93 homolog B1 (C. elegans)	+	1.20
13	<i>FAM220A</i>	Family with sequence similarity 220, member A	+	1.22
14	<i>EFEMP2</i>	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	+	1.20
15	<i>CD72</i>	CD72 molecule	+	2.73
16	<i>RHOD</i>	RAS homolog family member D	+	2.23
17	<i>CDCA3</i>	Cell division cycle associated 3	+	2.16
18	<i>EMID2</i>	EMI domain containing 2	+	1.39
19	<i>INTS5</i>	Integrator complex subunit 5	+	1.32
20	<i>CCDC85B</i>	Coiled-coil domain containing 85B	+	1.21
21	<i>CA9</i>	Carbonic anhydrase IX	+	4.82
22	<i>ABCF3</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3	+	1.19
23	<i>LEPREL2</i>	Leprecan-like 2	+	1.43
24	<i>ASB6</i>	Ankyrin repeat and SOCS box containing 6	+	1.20
25	<i>C1orf68</i>	Chromosome 11 open reading frame 68	+	1.48
26	<i>PLXDC2</i>	Plexin domain containing 2	-	-2.20
27	<i>STX1A</i>	Syntaxin 1A (brain)	+	1.32
28	<i>PAC1</i>	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	+	1.21
29	<i>ANO1</i>	Anoctamin 1, calcium activated chloride channel	+	1.34
30	<i>GANAB</i>	Glucosidase, alpha; neutral AB	+	1.29
31	<i>CCDC88B</i>	Coiled-coil domain containing 88B	+	1.17
32	<i>RPP25L</i>	Ribonuclease P/MRP 25 kDa subunit-like	+	1.28
33	<i>HINT2</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 2	+	1.27
34	<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi 1	+	1.36
35	<i>C7orf50</i>	Chromosome 7 open reading frame 50	+	2.17
36	<i>SPAG8</i>	Sperm associated antigen 8	+	1.39
37	<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase 1	+	1.56
38	<i>TTC9C</i>	Tetratricopeptide repeat domain 9C	+	1.32
39	<i>FBXL18</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 18	+	1.23
40	<i>FANCG</i>	Fanconi anemia, complementation group G	+	2.13
41	<i>MACROD1</i>	MACRO domain containing 1	+	1.16
42	<i>SSSCA1</i>	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1	+	1.17
43	<i>ALG3</i>	ALG3, alpha-1,3-mannosyltransferase	+	1.51
44	<i>ENO2</i>	Enolase 2 (gamma, neuronal)	+	2.60
45	<i>TNRC18</i>	Trinucleotide repeat containing 18	+	1.23
46	<i>GNB3</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3	+	1.23
47	<i>CDK2AP2</i>	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 2	+	1.25

NOTE: The genes are ranked according to score.

average fold change in genes selected normalized by 1 (unaltered reference) varied from -715.57 (*DCD*, dermcidin) to 16.34 (*AMTN*, amelotin), and the raw average fold change in these genes ranged from -8.48 (SD 1.75) to 5.03 (SD 2.45), respectively.

Integrative analysis: Driver candidate selection

Forty-seven driver candidates were selected by the CONEXIC algorithm as the top-ranked genes (Table 2). Only *PLXDC2* (mapping to 10p12.31) had a deletion that was concomitant with downregulation. The other genes had copy number gains and increased expression.

The expression data of the 47 possible drivers was subjected to association between them and the clinical and pathologic variables evaluated (Supplementary files S3 and S4).

All 47 genes were subjected to functional enrichment analysis using IPA, revealing the top three networks, associated with

carbohydrate metabolism, cellular maintenance, RNA posttranscriptional modification, and organ development (Fig. 1). The pathways and functions that correlated with these genes were examined and confirmed using KOBAS 2.0, as summarized in Supplementary File S5.

The evaluation of gene expression data revealed that only 19 of them were somehow associated with at least one of the clinical and pathologic variables, being *UNC93B1* the gene with the greater number of associations. Therefore, this gene did not appear in any of our *in silico* analysis, and it was discharged for further validation.

The following strategy was to evaluate those genes with greater number of clinical associations and along with *GNB3* others appeared showing possible relevance in VSCC (Supplementary files S3 and S4). However, of those with higher number of associations with the variables only *GNB3* had association with

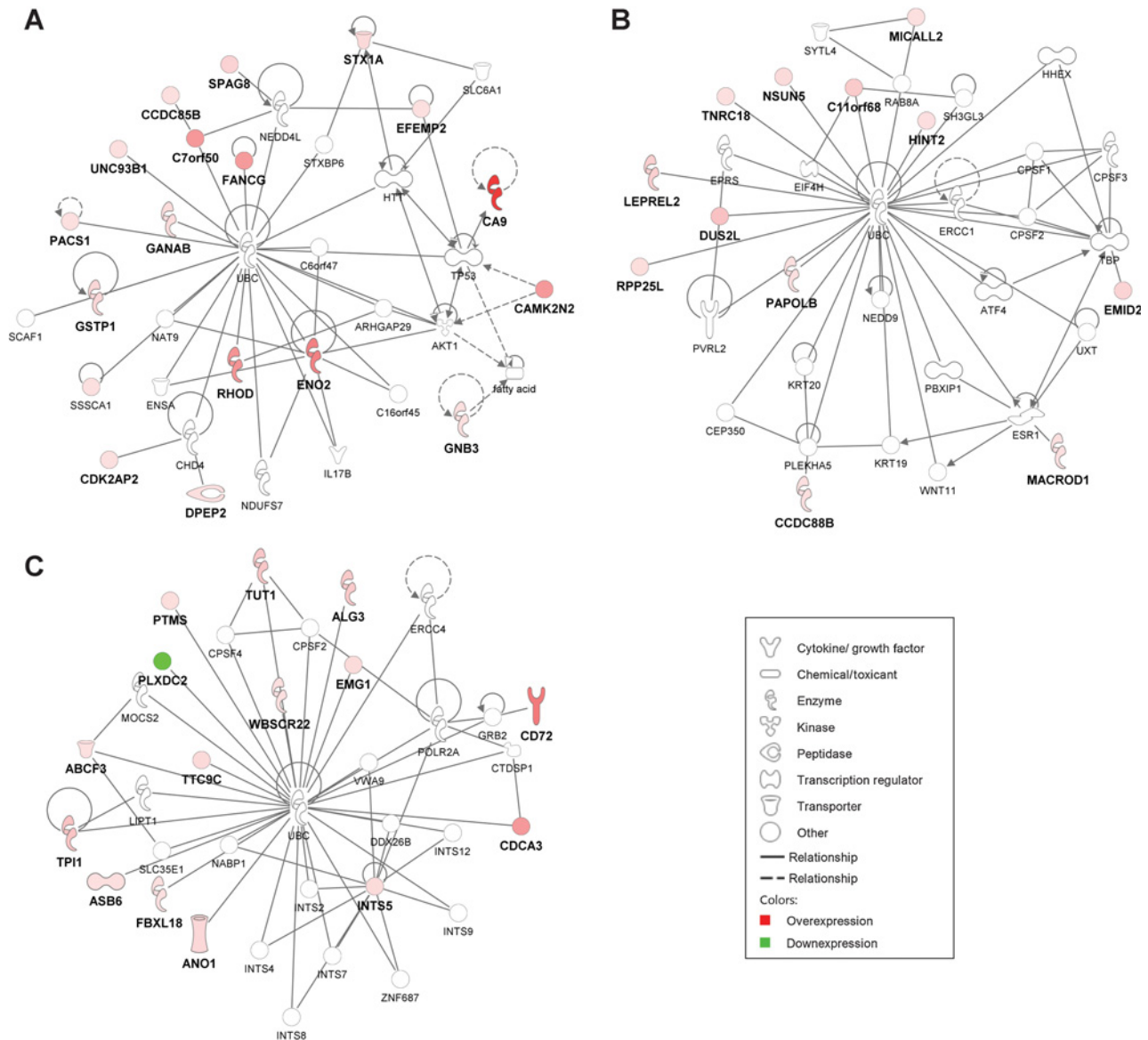


Figure 1. *In silico* analysis of top networks based on 47 possible driver genes by IPA. **A-C**, the top networks based on IPA software. The rectangle on the bottom right contains information on molecules regarding their function and expression.

lymph node metastasis, the best prognostic marker so far established. In addition, it was present in the *in silico* evaluation demonstrating its potential in tumoral process. Thus, it was selected for further validation along with *PLXDC2* that presented association with recurrence and more importantly was the only gene that presented loss of copy number associated with gene downregulation.

Data validation by qPCR and RT-qPCR

On the basis of our results, *PLXDC2* had one of the primer pair that corroborated the aCGH findings, with copy number loss (0.197) and the second was normal (0.616). *GNB3* was quantified, with mean copy number ranging from 0.619 to 0.693 (Supplementary File S5). The only significant association between

the qPCR results and clinicopathologic features was the correlation of a higher number of copies of the first sequence evaluated of *GNB3* with the presence of lymph node metastasis ($P = 0.03$; Table 3).

Overexpression of *GNB3* (RQ = 2.014; SD = 2.89) and low level of *PLXDC2* (RQ = 0.429; SD = 0.53; Supplementary File S6) versus normal samples were detected by RT-qPCR. However, no association between both genes with clinical and pathologic parameters was observed (Supplementary File S7).

IHC

GNB3 and *PLXDC2* were homogeneously expressed throughout the cytoplasm of cells from all vulvar tissue samples (Fig. 2). *PLXDC2* and *GNB3* evaluation in tumor adjacent normal tissue

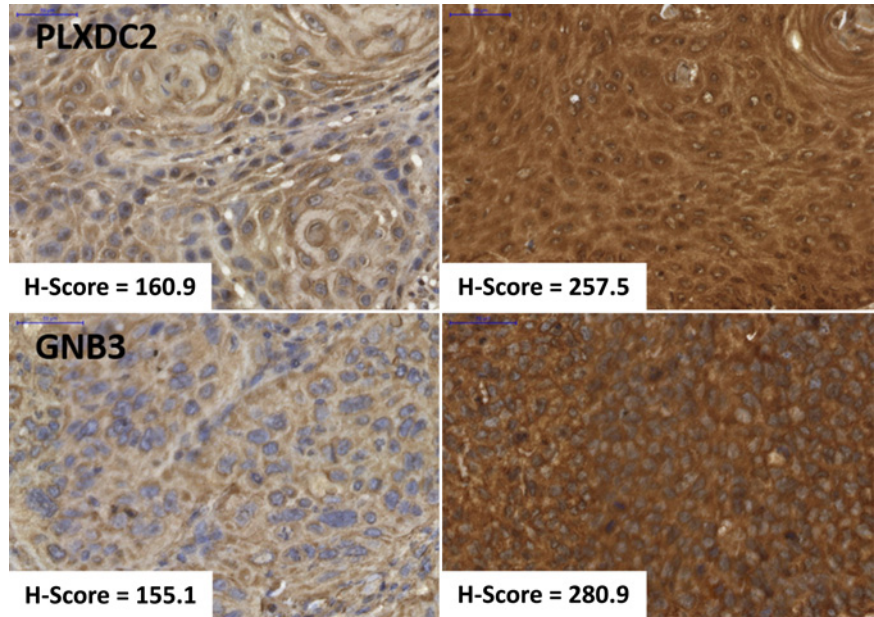


Figure 2. Immunohistochemical patterns of PLXDC2 and GNB3 proteins based on H-Score evaluation.

demonstrated that both have low expression in nontumoral tissues (Supplementary Files S8).

GNB3 had a median H-Score of 248.42 (range: 155.14–284.08), and that of PLXDC2 was 220.89 (range: 159.75–267.18).

GNB3 immunostaining was significantly higher in VSCC grade 1 and 2 ($P = 0.01$) and trended toward greater expression in cases

without vascular invasion ($P = 0.068$; Table 4). PLXDC2 expression was higher in cases without vascular and perineural invasion ($P = 0.011$ and $P = 0.032$, respectively; Table 4).

Patients who expressed more GNB3 experienced higher rates of disease-free survival (DFS). Conversely, high levels of PLXDC2 trended toward lower DFS and cancer-specific survival (CSS; Fig. 3).

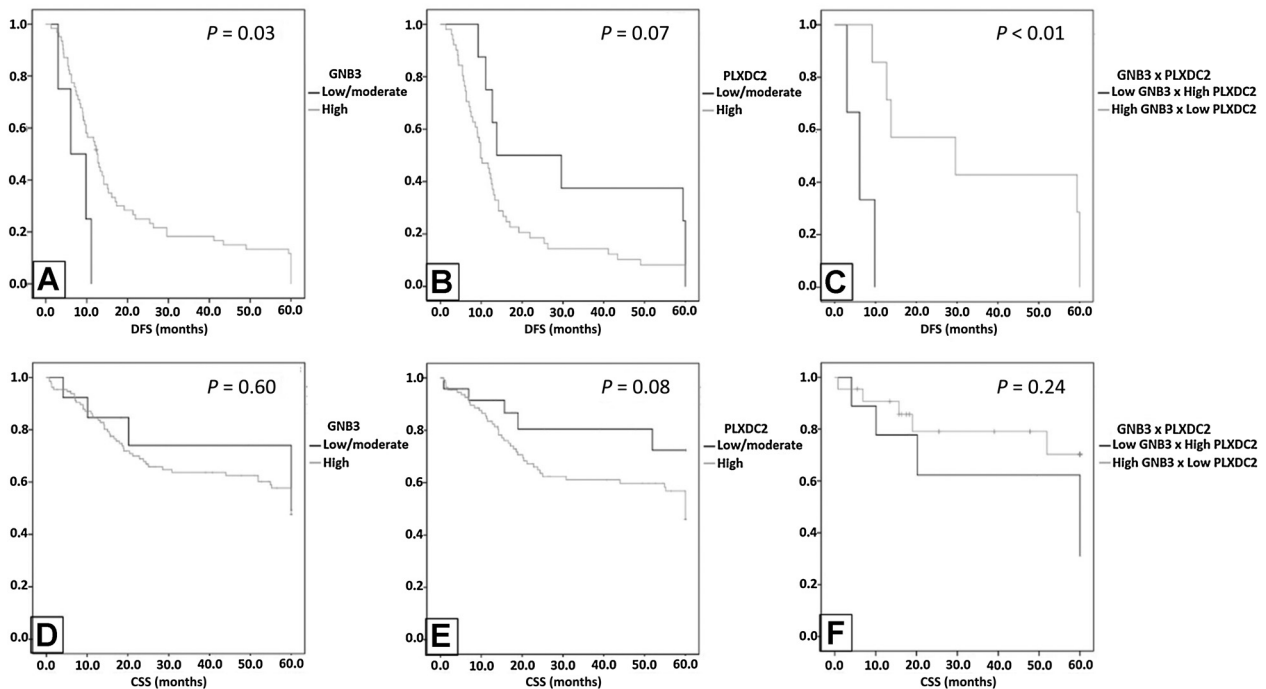


Figure 3. Cancer-specific (CSS) and disease-free survival (DFS) curves of GNB3 and PLXDC2 protein expression. **A–C**, DFS of GNB3, PLXDC2, and GNB3/PLXDC2, respectively; **D–F**, CSS of GNB3, PLXDC2, and GNB3/PLXDC2, respectively.

Table 3. Significant CNAs and their association with clinical and pathologic variables

Variables	GNB3-1			GNB3-2			PLXDC2-1			PLXDC2-2		
	N	Mean rank	P	N	Mean rank	P	N	Mean rank	P	N	Mean rank	P
Histology												
SCC1/2-Verrucous	6	6.75	0.81	6	7.17	0.52	6	3.92	0.01	6	6.67	0.87
CC3-Basaloid	6	6.25		6	5.83		6	9.08		6	6.33	
Invasion												
Superficial	4	5.88	0.67	4	7.50	0.49	4	6.38	0.93	4	6.00	0.73
Dermis Deep	8	6.81		8	6.00		8	6.56		8	6.75	
Vascular invasion												
Negative	10	7.40	0.23	10	7.75	0.42	10	7.70	0.38	10	6.80	0.07
Positive	6	10.33		6	9.75		6	9.83		6	11.33	
Perineural invasion												
Negative	11	7.23	0.11	11	7.50	0.21	11	8.05	0.57	11	7.23	0.11
Positive	5	11.30		5	10.70		5	9.50		5	11.30	
Lymph node metastasis												
Negative	4	2.75	0.03	4	3.50	0.14	4	5.50	0.62	4	4.00	0.33
Positive	5	6.80		5	6.20		5	4.60		5	5.80	
HPV infection												
Negative	5	8.90	0.82	5	6.00	0.16	5	6.10	0.17	5	6.10	0.17
Positive	11	8.32		11	9.64		11	9.59		11	9.59	
FIGO staging												
I-II	9	6.33	0.08	9	6.28	0.07	9	6.44	0.10	9	6.39	0.09
III-IV	6	10.50		6	10.58		6	10.33		6	10.42	
Recrudescence												
Negative	10	7.45	0.94	10	6.85	0.36	10	6.90	0.39	10	6.90	0.40
Positive	4	7.63		4	9.13		4	9.00		4	9.00	

High expression of GNB3, concomitant with low PLXDC2 levels, was detected in cases with little lymph node (0 or 1) metastasis ($P = 0.016$), characterized as FIGO I or II ($P = 0.037$; Table 5), and higher DFS rates ($P = 0.005$; Supplementary Fig. S4).

Discussion

Compared with normal DNA, we observed a few number of copy number losses in vulvar carcinoma samples, which has not been reported. However, most studies are not comparable with our findings, because they extracted DNA from FFPE (12, 13) or

cell lines (14, 15). Furthermore, some studies controlled for HPV, used disparate methods or lower-resolution platforms (12–15).

Gains in the long arm of chromosome 3 were frequent in our casuistic, which is a common finding in studies on VSCC (12–15) and other solid tumors (24). However, the normally concomitant findings with this imbalance (e.g., gains in chr8q and losses in chr3p and chr8p) were not observed. These alterations are generally found in solid tumors (24) and might mediate their development and progression (24). Yet, such abnormalities have not been shown to be important in vulvar cancer.

Thus, we proposed a novel approach, performing integrative analyses to identify driver genes that are involved in the initiation

Table 4. Association of H-Score based on protein expression of PLXDC2 and GNB3 and clinical and pathologic variables (Mann-Whitney test)

Variables	PLXDC2		GNB3	
	Mean rank	P	Mean rank	P
Histology				
SCC1/2-Verrucous	38.04	0.46	42.39	0.01*
CC3-Basaloid	33.83		27.60	
Invasion				
Superficial	44.37	0	42.09	0.09
Dermis deep	26.43		33.56	
Vascular invasion				
Negative	46.40	0.01	49.10	0.06
Positive	29.41		36.53	
Perineural invasion				
Negative	44.22	0.03	45.79	0.79
Positive	27.45		43.77	
Lymph node metastasis				
Negative	53.67	0.51	57.93	0.61
Positive	57.94		61.32	
HPV infection				
Negative	23.77	0.30	29.10	0.24
Positive	28.10		24.05	
FIGO staging				
I-II	66.27	0.49	72.48	0.99
III-IV	71.04		72.53	

Table 5. Association between inverse expression of PLXDC2 and GNB3 and clinical and pathologic variables (Mann-Whitney)

		Low GNB3 × high PLXDC2	High GNB3 × low PLXDC2	P
Histology	SCC1/2-Verrucous	4	12	0.85
	SCC3-Basaloid	2	5	
Vascular invasion	Absent	4	15	0.68
	Present	2	5	
Perineural invasion	Absent	5	16	0.85
	Present	1	4	
Lymph node metastasis	Absent	4	14	0.01
	Present	4	1	
FIGO staging	I+II	4	18	0.03
	III+IV	5	4	
HPV	Negative	1	11	0.27
	Positive	3	6	
Depth of invasion	Superficial and medial dermis	4	4	0.13
	Deep dermis and subcutaneous space	2	13	

and/or progression of VSCC and determine the function of certain regions and genes that have been implicated.

Possible driver selection for VSCC used CONEXIC as starting point for further selection. This method is not a usual method of aCGA and GWE integration as previously used by Micci and colleagues (2013; ref. 16). The CONEXIC methodology uncovers the "genomic footprint" by identifying genes located in regions amplified or deleted in some, but not all tumors and further associates their expression to a gene module, which is assumed to be altered by the driver (19). All this comparisons are made on the basis of validated algorithms which select the best candidate based not only in the assumption that altered copy number is leading to gene misregulation (19). Therefore, although Micci and colleagues (2013) has higher resolution and used similar quantity and quality of samples, this study has major discrepancies in terms of gene selection (16). In addition, this might explain the different pattern of alterations found in both studies as our study follows a different pathway to uncover the main actors in VSCC.

As expected, based on JISTIC analysis, loss of DNA copy number, concomitant with gene downregulation, was uncommon, which we detected in 1 of 47 potential drivers of VSCC. Thus, plexin domain-containing 2 (*PLXDC2*), a 473-kb gene in chr10p12.31, was selected for validation, despite scarce information on its involvement in cancer. Moreover, the lack of reports on its interactions and function might explain its seemingly minor contribution to biologic and molecular disorders, as evaluated *in silico* by IPA.

The enrichment analysis of 47 genes demonstrated that they interact in three principal networks that regulate several functions of cancer development and progression, corroborating their selection as potential drivers. One such molecular influences was the involvement of guanine nucleotide-binding protein (G protein) beta polypeptide 3 (*GNB3*) in carbohydrate metabolism, which is essential for cell growth and maintenance. Thus, *GNB3* was also selected for further validation and evaluation in a larger subset of samples.

PLXDC2, also known as *TEM7R* (tumor endothelial marker 7-related), has a related gene, *PLXDC1*, which was initially termed tumor endothelial marker 7 (*TEM7*; ref. 25). Although *PLXDC2* is usually upregulated with *PLXDC1* in stromal endothelial cells of several tumors, such as colorectal cancer (25), it does not appear to govern endothelial cell morphogenesis in these tumors like *PLXDC1* (25). Instead, *PLXDC2* participates in apoptosis and cell-cycle arrest (26) and is also associated with poor outcomes, a

worse prognosis, and lymph node metastasis in breast cancer (27). Regardless of the increasing association of this gene with tumor behavior, its function and interactions have not been examined.

There is significant evidence that supports our assumption that *PLXDC2* and its protein mediate the development and progression of VSCC, primarily in association with *GNB3* expression. As observed in this study, low levels of *PLXDC2*, concomitant with high expression of *GNB3*, mitigate lymph node metastasis, which is the major prognostic factor of VSCC (28). This association correlates with a better prognosis, because it is related to early-stage tumors (FIGO I and II) and higher DFS rates.

That *PLXDC2* does not act as a single modulator is corroborated by the lack of an association of *GNB3* alone with lymph node metastasis. *GNB3* is 7 kb and lies at chr12p13. Our study is the first to report the overexpression of *GNB3* in cancer, concomitant with copy number gains. The few studies that have analyzed *GNB3* examined the C825T SNP, which is associated with enhanced G protein function, increasing signal transduction through an alternative splice variant, referred to as Gβ3s (29, 30). The behavior of this variant depends on the tumor site. It is a good prognostic factor, reducing the risk of bone metastasis in patients with breast cancer (31) and increasing the survival of patients with glioblastomas (30) but is associated with worse outcomes for patients who carry this SNP, as in head and neck tumors (32).

We could not assume the status of allele 825 of *GNB3*; consequently, further studies might determine whether the upregulation of *GNB3*, concomitant with DNA gains, enhances its G protein activity and whether other alterations are present. Moreover, multimodal approaches (e.g., miRNAs and methylation analysis), integrated with our results, might increase our understanding of VSCC.

Our findings reveal novel aspects of VSCC and tumor behavior. In our previous study, we suggested that p16 is not completely linked with HPV infection, as has been proposed for years, based on the studies of cervix carcinomas, which are almost exclusively related to this infection (5). We hypothesize that there are genes less frequent and studied that mediate VSCC. Thus, our study describes a new model that does not involve the preconceived etiogenic pathways that are linked exclusively to HPV infection or p53 disruption (2, 33), because no gene was associated with either pathway in our analysis. In addition, low expression of both *GNB3* and *PLXDC2* in normal tissues might reflect their relevance in vulvar carcinogenesis and in tumor progression as they could

reflect a suppression mechanism feedback, imposed by PLXDC2 and a tumoral enhancer promoted by GNB3 expression.

This study proposes two novel genes, based on a robust integrative method that has never been used before to determine the prognosis of vulvar carcinoma. When inversely expressed, *PLXDC2* and *GNB3* predict lymph node metastasis and DFS, guiding the use of a more aggressive treatment modality and increasing the chances of curing VSCC patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: A.M. Lavorato-Rocha, I.S. Rodrigues, F.A. Soares, R.M. Rocha

Development of methodology: A.M. Lavorato-Rocha, E.M. Akagi, I.S. Rodrigues, M.C.S. Botelho, S.R. Rogatto

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A.M. Lavorato-Rocha, B. de Melo Maia, I.S. Rodrigues, G. Baiocchi, S.R. Rogatto

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A.M. Lavorato-Rocha, B. de Melo Maia, F.A. Marchi, G. Fernandes, F.A. Soares, S.R. Rogatto

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A.M. Lavorato-Rocha, B. de Melo Maia, I.S. Rodrigues, M.C.S. Botelho, F.A. Marchi, F.A. Soares, S.R. Rogatto, R.M. Rocha

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): A.M. Lavorato-Rocha, E.M. Akagi, G. Baiocchi, Y. Sato-Kuwabara

Study supervision: G. Baiocchi, Y. Sato-Kuwabara, R.M. Rocha

Acknowledgments

The authors thank the A.C. Camargo Cancer Center Biobank for providing human specimens.

Grant Support

This study was supported by CNPq, CAPES, and FAPESP.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 27, 2015; revised April 5, 2016; accepted April 21, 2016; published OnlineFirst May 11, 2016.

References

- Stroup AM, Harlan LC, Trimble EL. Demographic, clinical, and treatment trends among women diagnosed with vulvar cancer in U.S. *Gynecol Oncol* 2008;108:577–83.
- de Melo Maia B, Munhoz Cestari F, Lavorato-Rocha AM, Sant'Ana Rodrigues I, Baiocchi G, Cardoso Guimarães G, et al. Characterization of socio-demographic and clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 2013;75:53–60.
- Knopp S, Tropé C, Nesland JM, Holm R. A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. *J Clin Pathol* 2009;62:212–8.
- Lavorato-Rocha AM, de Melo Maia B, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Baiocchi G, da Silva Cestari FM, et al. Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein. *Ann Surg Oncol* 2013;20:31–9.
- Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Melo Maia B, Stiepcich MM, Baiocchi G, Carvalho KC, et al. Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. *Tumour Biol* 2013;34:3713–20.
- Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, de M Maia B, Stiepcich MM, de Carvalho FM, Baiocchi G, et al. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV. *Br J Cancer* 2013;109:184–94.
- de Melo Maia B, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Brot L, Baiocchi G, et al. EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. *Hum Pathol* 2014;45:917–25.
- Gasco M, Sullivan A, Repellin C, Brooks L, Farrell PJ, Tidy JA, et al. Coincident inactivation of 14–3-3sigma and p16INK4a is an early event in vulvar squamous neoplasia. *Oncogene* 2002;21:1876–81.
- Soufir N, Queille S, Liboutet M, Thibaudeau O, Bachelier F, Delestaing G, et al. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. *Br J Dermatol* 2007;156:448–53.
- Choschzick M, Hantaredja W, Tennstedt P, Gieseckig F, Wölber L, Simon R. Role of TP53 mutations in vulvar carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30:497–504.
- Oonk MH, Eijssink JJ, Volders HH, Hollema H, Wisman GB, Schuurings E, et al. Identification of inguinofemoral lymph node metastases by methylation markers in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 2012;125:352–7.
- Jee KJ, Kim YT, Kim KR, Kim HS, Yan A, Knuutila S. Loss in 3p and 4p and gain of 3q are concomitant aberrations in squamous cell carcinoma of the vulva. *Mod Pathol* 2001;14:377–81.
- Allen DG, Hutchins AM, Hammet F, White DJ, Scurry JP, Tabrizi SN, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridisation in vulvar cancers. *Br J Cancer* 2002;86:924–8.
- Raitanen M, Worsham MJ, Lakkala T, Carey TE, Van Dyke DL, Grénman R, et al. Characterization of 10 vulvar carcinoma cell lines by karyotyping, comparative genomic hybridization and flow cytometry. *Gynecol Oncol* 2004;93:155–63.
- Huang FY, Kwok YK, Lau ET, Tang MH, Ng TY, Ngan HY. Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;157:42–8.
- Micci F, Teixeira MR, Scheistrøen M, Abeler VM, Heim S. Cytogenetic characterization of tumors of the vulva and vagina. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:137–48.
- Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:6240–45.
- Micci F, Panagopoulos I, Haugom L, Dahlback HS, Pretorius ME, Davidson B, et al. Genomic aberration patterns and expression profiles of squamous cell carcinomas of the vulva. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52:551–63.
- Akavia UD, Litvin O, Kim J, Sanchez-Garcia F, Kotliar D, Causton HC, et al. An integrated approach to uncover drivers of cancer. *Cell* 2010;143:1005–17.
- Cirilo PDR, Marchi FA, Barros MC, Rocha RM, Domingues MAC, Pontes A, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals potential targets associated with cell proliferation in uterine leiomyomas. *PLoS One* 2013;8:e57901.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- Lavorato-Rocha AM, Anjos LG, Cunha IW, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. Immunohistochemical assessment of PTEN in vulvar cancer: best practices for tissue staining, evaluation, and clinical association. *Methods* 2015;77:8:20–4.
- Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003;34:369–76.
- Miller-Delaney SF, Lieberam I, Murphy P, Mitchell KJ. Plxdc2 is a mitogen for neural progenitors. *PLoS One* 2011;6:e14565.
- Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrard DF. The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* 2005;7:816–23.
- Davies G, Cunnick GH, Mansel RE, Mason MD, Jiang WG. Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2004;21:31–7.

28. Coulter J, Gleason N. Local and regional recurrence of vulval cancer: management dilemmas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:663–81.
29. Siffert W. Effects of the G protein beta 3-subunit gene C825T polymorphism: should hypotheses regarding the molecular mechanisms underlying enhanced G protein activation be revised? Focus on "A splice variant of the G protein beta 3-subunit implicated in disease states does not modulate ion channels". *Physiol Genomics* 2003;13:81–4.
30. El Hindy N, Adamzik M, Lambertz N, Bachmann HS, Worm K, Egen-sperger R, et al. Association of the GNB3 825T-allele with better survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:1423–9.
31. Clar H, Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, Leithner A, Gruber G, et al. A polymorphism in the G protein beta3-subunit gene is associated with bone metastasis risk in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:449–52.
32. Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Jahnke K, Lang S, et al. Association study of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism with disease progression and overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3203–7.
33. Hørding U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. *Gynecol Oncol* 1994;52:241–46.

SUPPLEMENTARY FILES

SUPPLEMENTARY FILE 1 – Sequence and conditions of *GNB3* and *PLXDC2* primers for RT-PCR

	Forward primer (5'-3')	MT°	GC%	Reverse primer (5'-3')	MT°	GC%
<i>PLXDC2</i>	GGGTAAAGTAGAAGCATCAT	54.9	40	TACTTAAGGTGAATGGGTAG	53.3	40
<i>PLXDC2</i>	GCCCAGCTTCTTTGATGTAA	61.8	45	TGCTCTTCTGGTGGTAGTTA	57.5	45
<i>GNB3</i>	CATGGAATCAAGGCAGAATC	62	45	AAGTGAGCAACAGAATTAGG	56	40
<i>GNB3</i>	CGTTTGGCCCTGTGACTAT	62.6	52.6	TACCAGGGTGCTACACTTTA	57.3	45

MT° - melting temperature; GC% - percentage of guanine (G) and cytosine (C)

SUPPLEMENTARY FILE 2 – Significantly altered regions present in more than twenty percent of the samples based aCGH data and performed in NEXUS software.

Region	Region Length	Cytoband Location	Event	Genes	miRNAs	P-Value	Gene Symbols
chr3:89,509,373-91,000,000	1490627	p11.1 - q11.1	CN Loss	2	0	0	EPHA3, U3
chr3:183,901,634-183,985,756	84122	q27.1	CN Gain	7	1	0,011	ABCF3, ALG3, AP2M1, CAMK2N2, ECE2, MIR1224, VWA5B2
chr3:185,441,159-186,199,853	758694	q27.2 - q27.3	CN Gain	7	1	0,011	C3orf65, DGKG, ETV5, IGF2BP2, LOC253573, LOC344887, TRA2B
chr7:1,018,068-1,561,560	543492	p22.3	CN Gain	12	1	0,023	AK090593, AK123998, AK127339, C7orf50, CYP2W1, GPER, GPR146, INTS1, MICALL2, MIR339, UNCX, ZFAND2A
chr7:4,742,850-6,686,992	1944142	p22.1	CN Gain	50	2	0,023	ACTB, AIMP2, ANKRD61, AP5Z1, BC040728, BC044606, BC045805, BC140723, C7orf26, C7orf70, CCZ1, CYTH3, DAGLB, DKFZp686J1569, DL492006, DQ579268, EIF2AK1, FAM220A, FBXL18, FOXC1, FSCN1, GRID2IP, KDELR2, KIAA0415, LOC389458, MIR4656, MIR589, MMD2, Mir_633, OCM, PAPOLB, PMS2, RAC1, RADIL, RBAK, RBAK-LOC389458, RNF216, RNF216-IT1, RNF216P1, RSPH10B, RSPH10B2, SLC29A4, TNRC18, USP42, WIPI2, ZDHHC4, ZNF815, ZNF815P, ZNF853, ZNF890P
chr7:72,326,056-73,167,919	841863	q11.23	CN Gain	37	1	0,003	ABHD11, ABHD11-AS1, AK127026, BAZ1B, BC018166, BC047594, BC050599, BC073780, BC110795, BCL7B, DNAJC30, DQ586658, DQ596866, DQ601342, FKBP6, FZD9, GTF2IP1, GTF2IRD2P1, LOC100093631, LOC541473, MIR4284, MLXIPL, NCF1, NCF1B, NSUN5, NSUN5P2, PMS2L2, POM121, SPDYE7P, SPDYE8P, STAG3L3, STX1A, TBL2, TRIM50, TRIM74, VPS37D, WBSCR22
chr7:73,923,217-74,005,743	82526	q11.23	CN Gain	1	0	0,003	GTF2IRD1
chr7:100,790,674-101,547,963	757289	q22.1	CN Gain	18	1	0,003	AK091729, AP1S1, BC027906, BC032716, BC039094, CLDN15, CUX1, EMID2, FIS1, MIR4653, MOGAT3, MYL10, Mir_324, NAT16, PLOD3, RABL5, VGF, ZNHIT1
chr9:9,184,822-9,938,565	753743	p23	CN Loss	2	0	0,006	Metazoa_SRP, PTPRD
chr9:33,956,788-34,642,450	685662	p13.3	CN Gain	23	0	0,045	ARID3C, C9orf23, C9orf24, C9orf25, CNTFR, DCAF12, DCTN3, DNAI1, DQ574810, DQ585850, DQ587955, DQ594696, DQ597117, ENHO, FAM219A, KIAA1161, KIF24, LOC415056, NUDT2, RPP25L, SIGMAR1, UBAP1, UBAP2
chr9:34,663,319-35,982,413	1319094	p13.3	CN Gain	47	1	0,045	ARHGEF39, ATP8B5P, AX748309, C9orf100, C9orf128, C9orf131, CA9, CCDC107, CCL19, CD72, CREB3, DNAJB5, DQ580826, DQ589555, FAM166B, FAM205A, FAM205B, FAM214B, FAM221B, FANCG, FP588, GBA2, HINT2, HRCT1, HV041854, KIAA1045, LOC158376, MIR4667, MSMP, NPR2, OR13J1, OR2S2, PIGO, RGP1, RMRP, RUSC2, SIT1, SPAG8, STOML2, TESK1, TLN1, TMEM8B, TPM2, UNC13B, VCP

chr9:130,270,402-130,467,008	196606	q33.3 - q34.11	CN Gain	4	1	0,031	BC032117, FAM129B, MIR3911, STXBP1
chr9:132,396,142-132,602,164	206022	q34.11	CN Gain	10	0	0,031	ASB6, C9orf78, METTL11A, Mir_652, NTMT1, PRRX2, PTGES, TOR1A, TOR1B, USP20
chr10:19,499,238-20,547,709	1048471	p12.31	CN Loss	6	0	0,032	AK297683, BC014575, C10orf112, PLXDC2, TRNA_Pseudo, U6
chr11:61,913,851-62,526,862	613011	q12.3	CN Gain	30	0	0,013	AHNAK, ASRGL1, B3GAT3, BSCL2, C11orf48, C11orf83, EEF1G, EML3, GANAB, GNG3, HNRNPUL2, HNRNPUL2-BSCL2, INCENP, INTS5, LRRN4CL, METTL12, MIR3654, MTA2, ROM1, SCGB1A1, SCGB1D1, SCGB1D2, SCGB1D4, SCGB2A1, SCGB2A2, SNORA57, TTC9C, TUT1, UBXN1, ZBTB3
chr11:63,665,028-64,109,397	444369	q13.1	CN Gain	25	0	0,013	AX747192, BAD, C11orf20, CCDC88B, COX8A, DNAJC4, ESRRA, FERMT3, FKBP2, FLRT1, GPR137, KCNK4, MACROD1, MARK2, NAA40, NUDT22, OTUB1, PLCB3, PPP1R14B, PRDX5, RCOR2, STIP1, TRMT112, TRPT1, VEGFB
chr11:65,268,668-67,790,779	2522111	q13.1 - q13.2	CN Gain	119	3	0,013	ACTN3, ACY3, ADRBK1, AF113016, AIP, AK057681, AK091996, AK125412, AK129926, ALDH3B1, ALDH3B2, ANKRD13D, AP5B1, AX746604, AX747485, AX747517, B3GNT1, BANF1, BBS1, BC010924, BRMS1, C11orf68, C11orf72, C11orf80, C11orf86, CABP2, CABP4, CARNS1, CATSPER1, CCDC85B, CCDC87, CCS, CD248, CDK2AP2, CFL1, CLCF1, CNIH2, CORO1B, CST6, CTSF, CTSW, DKFZp434M1735, DKFZp761E198, DOC2GP, DPP3, DQ584669, DQ587981, DRAP1, EFEMP2, EHBP1L1, EIF1AD, FAM86C2P, FAM89B, FIBP, FOSL1, GAL3ST3, GPR152, GSTP1, KAT5, KCNK7, KDM2A, KLC2, LOC100130987, LOC254100, LRFN4, LTBP3, MALAT1, MAP3K11, MIR4489, MIR4690, MIR548AR, MRPL11, MUS81, NDUFV1, NPAS4, NUDT8, OVOL1, PACS1, PC, PCNXL3, PELI3, PITPNM1, POLD4, PPP1CA, PTPRCAP, RAB1B, RAD9A, RBM14, RBM14-RBM4, RBM4, RBM4B, RCE1, RELA, RHOD, RIN1, RNASEH2C, RPS6KB2, SART1, SCYL1, SF3B2, SIPA1, SLC29A2, SNX32, SPTBN2, SSH3, SSSCA1, SYT12, TBC1D10C, TBX10, TMEM134, TMEM151A, TRNA_Ser, TSGA10IP, U7, UNC93B1, X15673, YIF1A, ZDHHC24
chr11:67,813,989-68,223,285	409296	q13.2	CN Gain	6	0	0,013	AX747648, C11orf24, CHKA, LRP5, SUV420H1, TCIRG1
chr11:69,761,013-70,537,888	776875	q13.3 - q13.4	CN Gain	12	1	0,013	AK097446, AK125463, AK128563, ANO1, BC127192, BC131767, CTTN, FADD, MIR548K, PPFIA1, SHANK2, SHANK2-AS1
chr12:6,649,349-7,084,848	435499	p13.31	CN Gain	37	2	0,022	ACRBP, AK096395, AK097957, ATN1, C12orf53, C12orf57, CD4, CDCA3, CHD4, COPS7A, DSTNP2, EMG1, ENO2, GNB3, GPR162, IFFO1, ING4, LAG3, LEPREL2, LPAR5, LRRC23, MIR141, MIR200C, MLF2, NOP2, PHB2, PIANP, PTMS, PTPN6, RPL13P5, RRPL13L, SCARNA11, SCARNA12, SPSB2, TP11, USP5, ZNF384

chr14:77,348,962-77,556,014	207052	q24.3	CN Gain	3	0	0,044	AK124327, BC038792, IRF2BPL
chr15:20,102,541-22,646,888	2544347	q11.1 - q11.2	CN Gain	40	5	0,018	AJ004954, BC107108, CHEK2P2, CT60, CXADRP2, DQ571479, DQ572979, DQ573684, DQ576041, DQ578838, DQ582073, DQ582260, DQ582939, DQ583164, DQ587539, DQ590589, DQ592463, DQ594309, DQ595048, DQ595648, DQ600342, DQ786202, GOLGA6L6, GOLGA8C, GOLGA8CP, HERC2P3, HERC2P7, JA429730, LOC348120, LOC646214, LOC727924, NBEAP1, NF1P2, OR4M2, OR4N3P, OR4N4, POTE3, RREP3, abParts
chr16:67,895,380-68,057,413	162033	q22.1	CN Gain	13	0	0,017	AK125818, CTRL, DDX28, DPEP2, DPEP3, DUS2L, EDC4, LCAT, NRN1L, NUTF2, PSKH1, PSMB10, SLC12A4
chr18:14,130,295-14,928,854	798559	p11.21	CN Loss	16	1	0,006	ANKRD20A5P, ANKRD30B, CXADRP3, CYP4F35P, DQ573684, DQ582260, DQ583164, DQ587539, DQ590126, DQ590589, DQ593719, DQ595048, DQ596206, MIR3156-2, POTE3, ZNF519
chr18:19,623,019-20,330,743	707724	q11.2	CN Gain	2	0	0,002	CTAGE1, GATA6
chr18:62,997,869-63,925,189	927320	q22.1	CN Loss	1	0	0,031	CDH7
chr19:12,858,097-12,893,837	35740	p13.2	CN Gain	3	0	0,007	ASNA1, BEST2, HOOK2
chr21:9,833,482-9,834,682	1200	p11.2	CN Loss	0	0	0	
chrY:6,948,756-7,180,595	231839	p11.2	CN Loss	2	0	0,018	PRKY, TBL1Y
chrY:17,618,801-19,419,157	1800356	q11.221	CN Loss	0	0	0,009	
Region	Region Length	Cytoband Location	Event	Genes	miRNAs	P-Value	Gene Symbols
chr3:89,509,373-91,000,000	1490627	p11.1 - q11.1	CN Loss	2	0	0	EPHA3, U3
chr3:183,901,634-183,985,756	84122	q27.1	CN Gain	7	1	0,011	ABCF3, ALG3, AP2M1, CAMK2N2, ECE2, MIR1224, VWA5B2
chr3:185,441,159-186,199,853	758694	q27.2 - q27.3	CN Gain	7	1	0,011	C3orf65, DGKG, ETV5, IGF2BP2, LOC253573, LOC344887, TRA2B

SUPPLEMENTARY FILE 3 – Functions associated with the 47 driver candidates. Evaluation performed using Ingenuity Pathways Analysis and KOBAS 2.0.

Function	Classification by IPA	KOBAS
Glycolysis I	Canonical Pathway	Confirmed
Sucrose degradation V	Canonical Pathway	Confirmed
Dolichyl-diphosphooligosaccharide biosynthesis	Canonical Pathway	Not confirmed
Leukotriene biosynthesis	Canonical Pathway	Confirmed
Gaq signaling	Canonical Pathway	Not confirmed
Tumor morphology	Biological function	Confirmed
RNA post-transcriptional modification	Molecular function	Confirmed
Cell death and survival	Molecular function	Confirmed
Cellular function and maintenance	Molecular function	Confirmed
Carbohydrate metabolism	Molecular function/ Top Networks	Confirmed
Cellular maintenance	Top networks	Confirmed
RNA post-transcriptional modification	Top networks	Confirmed
Organ development	Top networks	Confirmed

SUPPLEMENTARY FILE 4 – Relative and absolute quantification of *GNB3* and *PLXDC2*

		Mean	SD
Expression	<i>GNB3</i> *	2.01	2.88
	<i>PLXDC2</i> *	0.42	0.52
Copy number	<i>GNB3-1</i> **	0.69	0.37
	<i>GNB3-2</i> **	0.61	0.22
	<i>PLXDC2-1</i> **	0.19	0.18
	<i>PLXDC2-2</i> **	0.61	0.33

*Relative quantification (RQ). **Absolute quantification.

SUPPLEMENTARY FILE 5 – Association between *PLXDC2* and *GNB3* expression and clinical and pathological variables (Mann-Whitney test)

Variables	<i>GNB3</i>			<i>PLXDC2</i>		
	<i>N</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>P</i>
Histology						
SCC1/2-Verrucous	7	7.00	1	7	6.57	0.66
CC3-Basaloid	6	7.00		6	7.50	
Invasion						
Superficial	4	7.25	0.87	4	7.25	0.87
Dermis Deep	9	6.89		9	6.89	
Vascular Invasion						
Negative	10	8.20	0.74	10	8.90	0.66
Positive	6	9.00		6	7.83	
Perineural Invasion						
Negative	12	8.58	0.90	4	9.33	0.22
Positive	4	8.25		16	6.00	
Lymph Node Metastasis						
Negative	5	5.00	0.60	5	5.60	0.91
Positive	5	6.00		5	5.40	
HPV Infection						
Negative	6	9.33	0.58	6	9.17	0.66
Positive	10	8.00		10	8.10	
FIGO Staging						
I-II	10	8.20	0.80	10	8.40	0.62
III-IV	5	7.60		5	7.20	
Recurrence						
Negative	11	7.73	0.69	11	6.82	0.09
Positive	4	8.75		4	11.25	

Anexo 4 - Artigo publicado na revista BMC Cancer em 2014 em parceria com a doutora Erika Mie Akagi referente a dados obtidos no presente trabalho.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

ROCK1 as a novel prognostic marker in vulvar cancer

Erica M Akagi¹, André M Lavorato-Rocha¹, Beatriz de Melo Maia¹, Iara S Rodrigues¹, Kátia C Carvalho², Monica M Stiepcich³, Glauco Baiocchi⁴, Yukie Sato-Kuwabara⁵, Silvia R Rogatto⁶, Fernando A Soares^{1,5} and Rafael M Rocha^{1,7*}

Abstract

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

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

Results: In each pair of samples, *ROCK1* levels were higher by qRT-PCR in normal tissue compared with the tumour samples ($p = 0.016$). By IHC, 100% of invasive front areas of the tumour and 95.8% of central tumour areas were positive for ROCK1. Greater expression of ROCK1 was associated with the absence of lymph node metastasis ($p = 0.022$) and a lower depth of invasion ($p = 0.002$). In addition, higher ROCK1 levels correlated with greater recurrence-free survival ($p = 0.001$). Loss of ROCK1 was independently linked to worse cancer-specific survival ($p = 0.0054$) by multivariate analysis. This finding was validated by IHC, which demonstrated enhanced protein expression in normal versus tumour tissue ($p < 0.001$). By aCGH, 42.9% of samples showed a gain in copy number of the ROCK1 gene.

Conclusions: ROCK1 is lower expressed in tumour tissue when compared with adjacent normal vulvar epithelia. In an independent sample set of VSCCs, lower expression levels of ROCK1 correlated with worse survival rates and a poor prognosis. These findings provide important information for the clinical management of vulvar cancer.

Keywords: Vulvar carcinoma, ROCK1, qRT-PCR, Immunohistochemistry, aCGH, Prognosis

* Correspondence: rafael.malagoli@gmail.com

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

⁷Molecular Morphology Laboratory, AC Camargo Cancer Center, Rua Antônio Prudente, 109. 1o Andar, Patologia Investigativa, Liberdade, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

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

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

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

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

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

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

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

Methods

Patient and sample selection

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

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

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

RNA extraction from fresh frozen samples

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

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

Gene expression was analyzed by RT-qPCR on an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the TaqMan Universal PCR Master Mix detection system (Applied Biosystems), according to the supplier's specifications. Primers and probes for *ROCK1* (Hs01127688_m1)

were purchased from Applied Biosystems. *HPRT* was used as an endogenous control. Data analyses were performed, comparing adjacent normal and tumorous vulvar samples. The Pfaffl [26] method was used to obtain relative quantification (RQ) values and determine gene expression levels [26].

Immunohistochemistry

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

Evaluation of immunohistochemistry

Slides were digitalized on an APERIO® scanner and scored visually. IHC expression patterns were evaluated quantitatively, wherein expression levels were scored by the percentage of positive cells and the intensity of immunostaining [$HScore = \sum (ix Pi)$ and Pi : percentage of positive pixels, ranging from 0% to 100% and color intensity of the pixel $i = 0, 1, 2, \text{ or } 3$], ranging between 20 and 250 per Rodrigues et al. [25]. Final HScores were defined as $HScore = 1$ when the positivity was weak, with staining intensity ranging from 20 to 149 and $HScore = 2$ for strong staining and a staining intensity of ≥ 150 . ROCK1 immunostaining was present in all samples.

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

Array based-comparative genomic hybridization array (aCGH)

Based on our ROCK1/mRNA and protein data, we examined ROCK1 copy number alterations in vulvar carcinoma samples by array-CGH using data from a parallel study. A total of 200 ng each of tumour DNA and normal commercially available DNA (Human Genomic DNA: Female; Promega, Madison, USA) were analyzed compared on an 8×60 K Agilent platform for aCGH (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA).

The labeling, hybridization, and washes were performed per the Agilent Oligonucleotide Array-Based

CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic Labeling kit protocol (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA). The slides were scanned on a DNA microarray scanner with SureScan High-Resolution Technology (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA), based on HG19, and the results were extracted using Feature Extraction, v10.7.3.1 (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA). Copy number analysis was performed using Nexus Copy Number Software, v6.0 (Biodiscovery, El Segundo, USA).

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

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

Statistical analysis

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

Results

Demographic and clinicopathological features

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

Forty eight percent of the patients were HPV-positive, most of whom had the subtypes HPV16 (48%), HPV33 (24%), and HPV18 (15%). Associated lesions were present, such as vulvar intraepithelial neoplasias (VINs; 13.5% of patients) and lichen sclerosus (6.25%). Based on the histological diagnosis, moderately differentiated squamous cell carcinomas (SCC2) was the most prevalent form (46%), followed by SCC1 (34%), basaloid (9%), SCC3 (8%), sarcomatoid (2%), and verrucous carcinoma (1%). Most tumours

were classified as FIGO stage IB (53.1%), followed by stage IIIB (20.3%), IIIA (12.1%), II (6.2%), IIIC (6.2%), and IVA (2.1%). Of the 96 patients with VSCC, 34.4% died due to the cancer, and 46.9% expired due to other causes.

ROCK1 mRNA expression

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

ROCK1 immunostaining

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

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

between ROCK1 positivity and HPV infection, histological type, FIGO stage, recurrence, or vascular invasion.

ROCK1 expression and patient survival

Patients with lower expression of ROCK1 in the central tumour and invasive front had lower recurrence-free survival rates ($p = 0.004$ and $p = 0.001$, respectively; Figure 4A and B), and those with weak ROCK1 expression in the invasive front experienced lower cancer-specific survival ($p < 0.001$; Figure 4C and D). By multivariate analysis, high ROCK1 expression in the invasive front was independently associated with greater cancer-specific survival (HR 0.3, 95% CI 0.11–0.84, $p = 0.0054$; Table 1). The clinicopathological characteristics were analyzed by Cox regression. Lymph node metastasis (data not shown) and vascular invasion were independently associated with decreased of the survival ($p = 0.0074$ and 0.0365 , respectively).

aCGH analysis

By aCGH analysis, 29 regions underwent significant copy number alterations: 9 were associated with copy number loss (8p23.3, 5q11.1-q11.2, 3p11.1-q11.1, 9p23, 21p11.2-p11.1, Xq28, 7q36.3, 19p13.3, and 21p11.2), and 20 had gains (1q22, 20q11.21-q11.23, 1p36.23-p36.22, 11q13.3, 19q13.12, 19q13.32, 7q11.21, 7q11.22, 7q11.23, 7q11.23, 7q22.1, 11q12.2-q12.3, 11q12.3, 11q13.2, 16q22.1, 18q11.1-

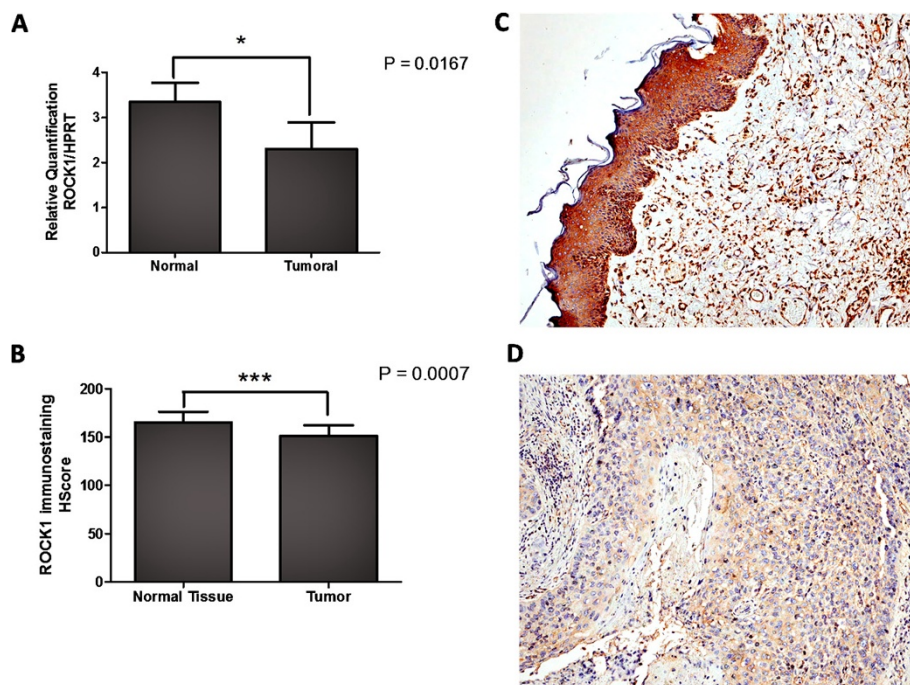


Figure 1 ROCK 1 mRNA and protein are overexpressed in normal tissues. ROCK1 is overexpressed by qRT-PCR analysis in normal adjacent samples compared with tumour samples ($p = 0.016$, **A**). Increased ROCK1 immunostaining HScore in normal epithelium compared with tumour in a subset of samples ($n = 21$)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

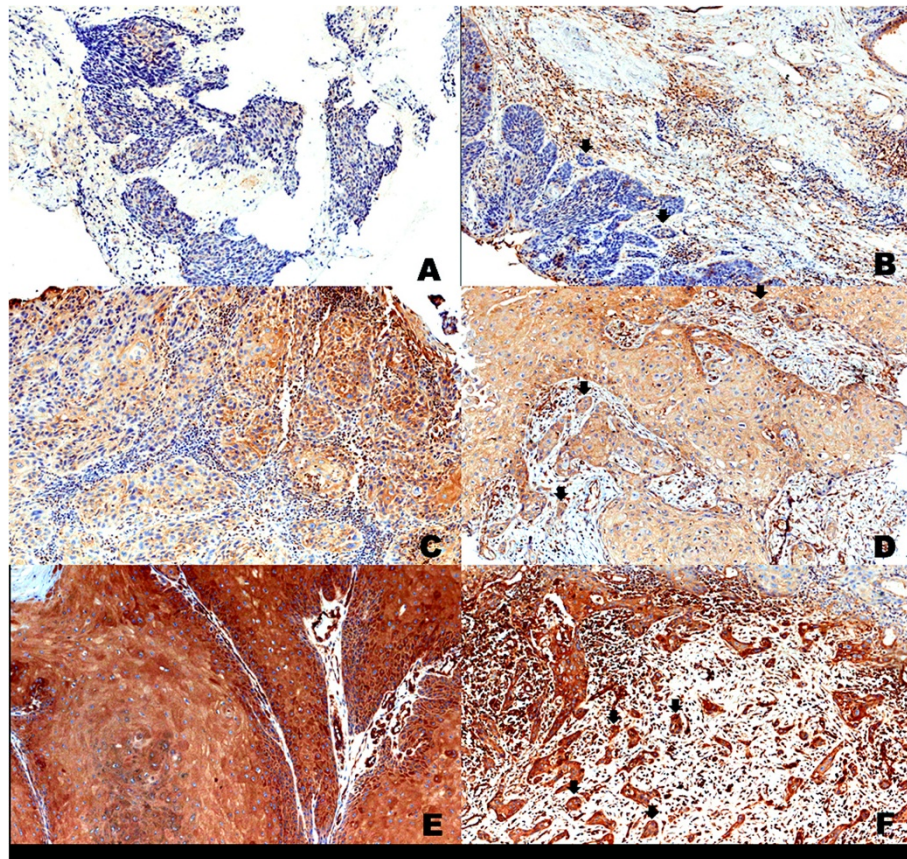


Figure 2 Immunohistochemical staining of ROCK1 in vulva carcinoma. Representative image of weak-positive staining in central tumour (A) and invasive front (B, arrows); moderate staining in the central tumour (C) and invasive front (D, arrows); strong-positive staining in central magnification. Images A and B were captured at 200× magnification. Images C, D, E, and F were captured at 400× magnification.

q11.2, 18q11.2, 7p22.2-p22.1, 12q24.31, and 15q11.1-q11.2). Of the latter, region 18q11.1-q11.2, which harbors *ROCK1*, had more copies than the reference DNA in 42.9% of samples (Figure 5).

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

Discussion

ROCK has significant functions in cancer progression and metastasis, rendering it a potential therapeutic target [9]. In this study, we examined the function of the Rho-associated protein kinase *ROCK1* in human vulvar carcinoma. Our data showed that aspects that are related to a good prognosis, such as the absence of lymph node metastasis, lower depth of invasion, and better survival, correlated with *ROCK1* immunoexpression, suggesting that *ROCK1* is a marker of good prognosis in vulvar cancer.

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

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

Inhibition of *ROCK/Rho-kinase* in Ras-transformed cells is insufficient to effect a motile phenotype in them,

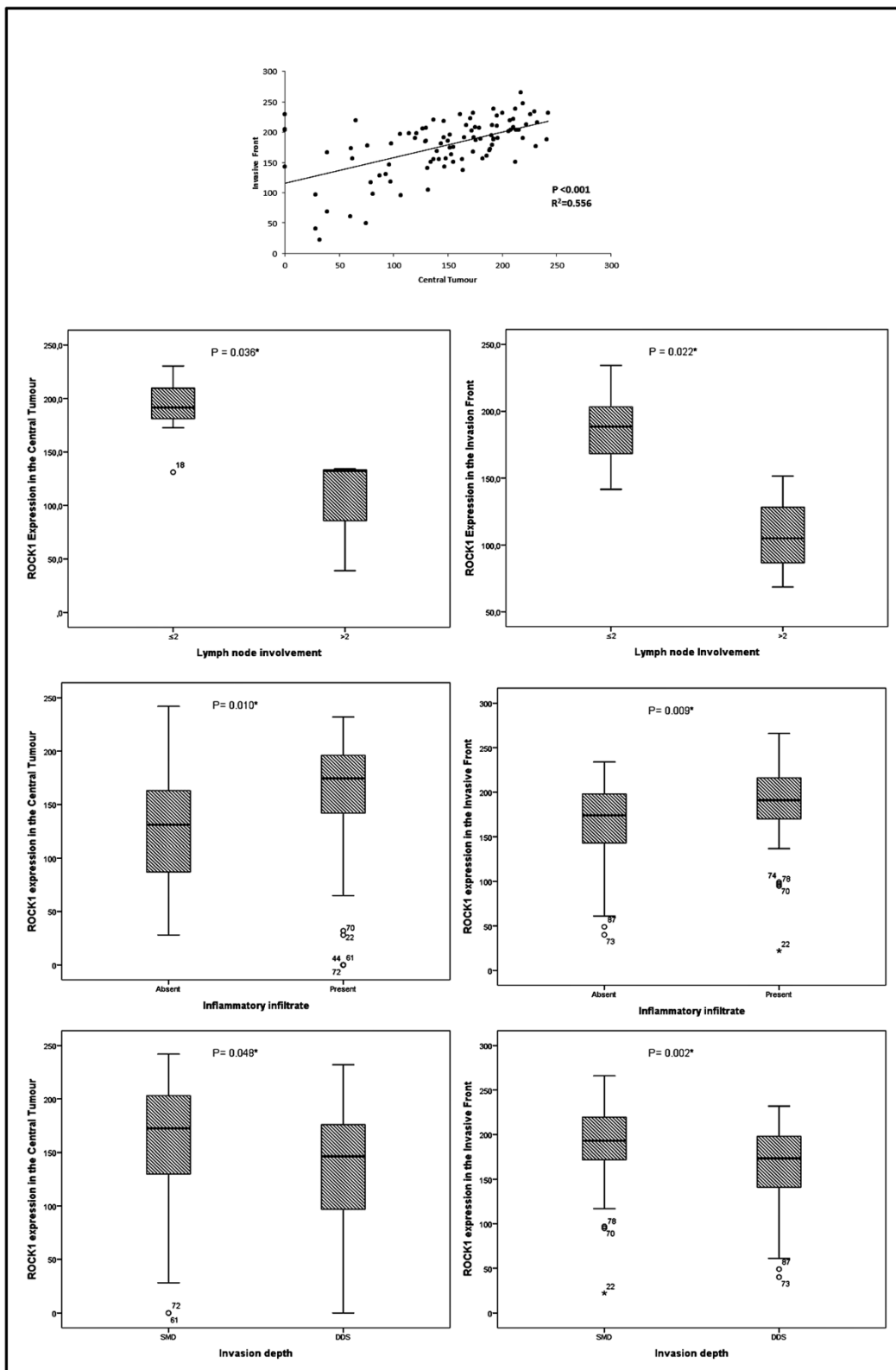


Figure 3 Association between clinicopathological features and ROCK1 in vulvar carcinoma. Abbreviations: $\leq 2 = 2$ or fewer lymph nodes involved; $> 2 =$ more than 2 lymph nodes involved; SMD = superficial and mid-dermis; DDA = deep dermis and subcutaneous tissues. *Statistically significant, $p <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

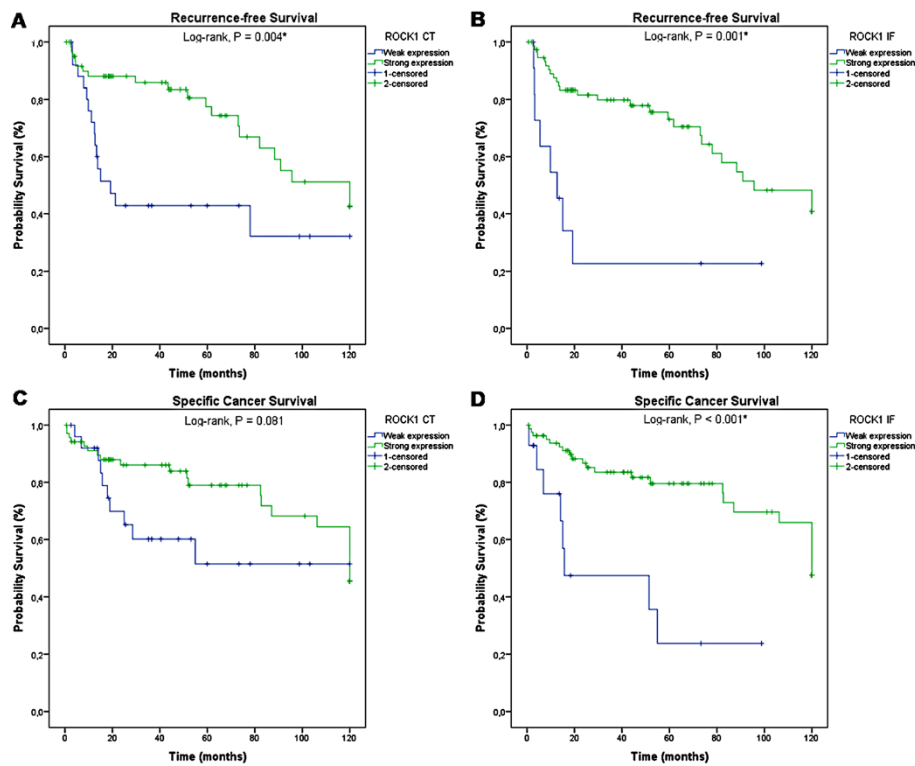


Figure 4 Kaplan-Meier survival curves for ROCK1 staining. Increased expression of ROCK1 in the central tumour ($p = 0.004$; **A**) and in the invasive front ($p = 0.001$; **B**) correlates with better recurrence-free survival and lower cancer-specific survival in the central tumour ($p = 0.081$; **C**)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

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

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

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

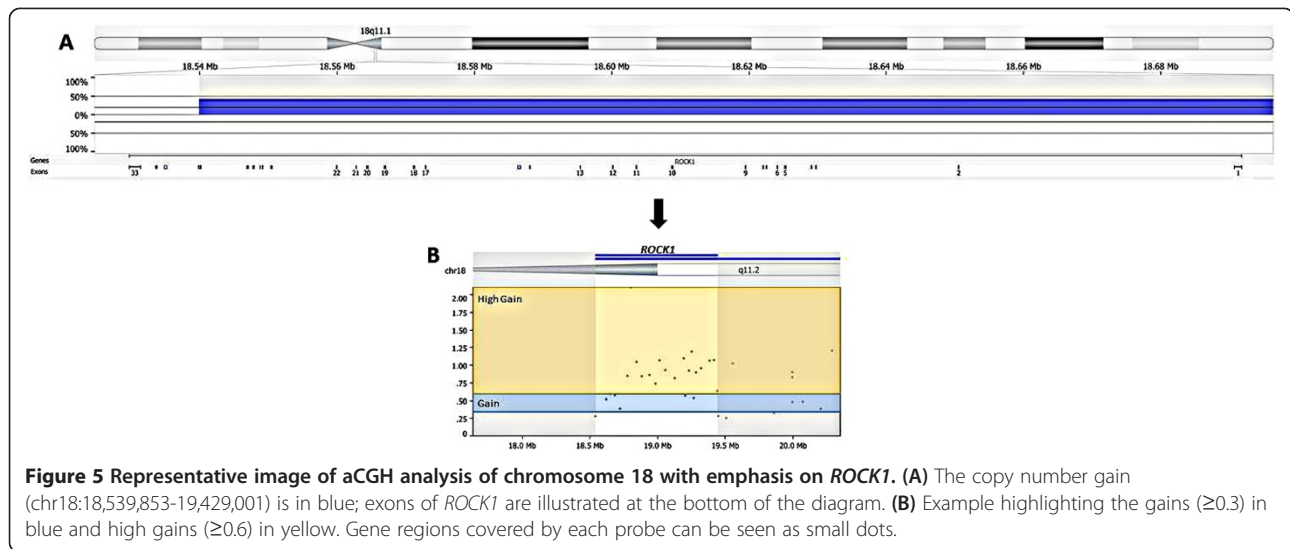


Figure 5 Representative image of aCGH analysis of chromosome 18 with emphasis on ROCK1. (A) The copy number gain (chr18:18,539,853-19,429,001) is in blue; exons of ROCK1 are illustrated at the bottom of the diagram. (B) Example highlighting the gains (≥ 0.3) in blue and high gains (≥ 0.6) in yellow.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

suggesting that this cell type requires changes in other regulators of the cytoskeleton to increase its motility [32]. Notably, elongated cells, such as SW-962, a vulvar squamous cell carcinoma metastatic cell line do not require Rho or ROCK function, unlike cells that move through rounded, or amoeboid, movement [21,37,38].

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

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

Clinicopathological characteristics analyzed by Cox regression demonstrated that lymph node metastasis and vascular invasion were independently associated with decreased of the survival, indicating that these features are related to poor survival in patients with VSCC. Also, higher expression of ROCK1 was linked to greater

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

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

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

ROCK1 copy number gains were detected in 42.9% of our samples. However, these data are controversial, because ROCK1 was more highly expressed in normal tissue by IHC and RT-qPCR compared with tumour

samples. Although associations between copy number and gene expression comprise the concomitant amplification of the gene with enhancement of its expression, there remain other genes, approximately 50% [43], the amplification of which does not correspond to gene overexpression.

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

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

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

Conclusions

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

Abbreviations

ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; VSCC (or SCC): vulvar squamous cell carcinoma; HPV: human papillomavirus; IHC: immunohistochemistry; qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction; aCGH: array-based comparative genomic hybridization; MLC: myosin light chain; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics; FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded; PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the research studies: RMR, EMA. Performed the experiments: EMA, AMLR, YSK, KCC. Analyzed and interpreted the data: EMA,

AMLR, BMM, RMR. Contributed with reagents/materials/analysis tools: ISR, KCC, MMS, GB, YSK, SRR, FAS. Drafted the manuscript: EMA, BMM, AMLR, SRR, RMR. Pathological revision: MMS. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

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

Author details

¹Molecular Morphology Laboratory, Investigative Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. ²Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine of São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil. ³Pathology Department, Fleury Institute, São Paulo, SP, Brazil. ⁴Department of Gynecology Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. ⁵Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. ⁶NeoGene Laboratory, AC Camargo Cancer Center, São Paulo and Department of Urology, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. ⁷Molecular Morphology Laboratory, AC Camargo Cancer Center, Rua Antônio Prudente, 109. 1o Andar, Patologia Investigativa, Liberdade, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil.

Received: 3 June 2014 Accepted: 10 October 2014

Published: 7 November 2014

References

1. De Melo MB, Munhoz Cestari F, Lavorato-Rocha AM, Sant'Ana Rodrigues I, Baiocchi G, Cardoso Guimarães G, Vassallo J, Stiepcich M, Soares FA, Malagoli Rocha R: **Characterization of sociodemographic and clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma.** *Gynecol Obstet Invest* 2013, **75**(1):53-60.
2. Lavorato-Rocha AM, De Melo Maia B, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Baiocchi G, Da Silva Cestari FM, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM: **Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein.** *Ann Surg Oncol* 2013, **20**(11):31-39.
3. Trietsch MD, Peters AA, Gaarenstroom KN, Van Koningsbrugge SH, Ter Haar NT, Osse EM, Halbesma N, Fleuren GJ: **Spindle cell morphology is related to poor prognosis in vulvar squamous cell carcinoma.** *Br J Cancer* 2013, **109**(8):2259-2265.
4. Del Pino M, Rodríguez-Carunchio L, Ordi J: **Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma.** *Histopathology* 2013, **62**(1):161-175.
5. De Melo MB, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, Baiocchi G, Cestari FM, Stiepcich MM, Chinen LT, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM: **Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside.** *J Transl Med* 2012, **10**:150.
6. Allen DG, Hutchins AM, Hammet F, White DJ, Scurry JP, Tabrizi SN, Garland SM, Armes JE: **Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridisation in vulvar cancers.** *Br J Cancer* 2002, **86**(6):924-928.
7. Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A: **Regulation of ROCK activity in cancer.** *J Histochem Cytochem* 2013, **61**(3):185-198.
8. Banyard J, Anand-Apte B, Symons M, Zetter BR: **Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases.** *Oncogene* 2000, **19**(4):580-591.
9. Majid S, Dar AA, Saini S, Shahryari V, Arora S, Zaman MS, Chang I, Yamamura S, Chiyomaru T, Fukuhara S, Tanaka Y, Deng G, Tabatabai ZL, Dahiya R: **MicroRNA-1280 inhibits invasion and metastasis by targeting ROCK1 in bladder cancer.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46743.
10. Vigil D, Kim TY, Plachco A, Garton AJ, Castaldo L, Pachter JA, Dong H, Chen X, Tokar B, Campbell SL, Der CJ: **ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion.** *Cancer Res* 2012, **72**(20):5338-5347.
11. Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M: **Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation.** *Anticancer Res* 2009, **29**(1):119-123.
12. Liu X, Choy E, Hornicek FJ, Yang S, Yang C, Harmon D, Mankin H, Duan Z: **ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma.** *J Orthop Res* 2011, **29**(8):1259-1266.

13. Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP: **Rho-Kinase inhibitor retards migration and *in vivo* dissemination of human prostate cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **269**(3):652–659.
14. Zhang C, Zhang S, Zhang Z, He J, Xu Y, Liu S: **ROCK has a crucial role in regulating prostate tumor growth through interaction with c-Myc.** *Oncogene* 2013, 1–10. doi:10.1038/onc.2013.505. [Epub ahead of print].
15. Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG: **The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer.** *Int J Oncol* 2008, **33**(3):585–593.
16. Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K, Kurachi H: **Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cells.** *Cancer Biol Ther* 2012, **13**(1):25–33.
17. Wong CC, Wong CM, Ko FC, Chan LK, Ching YP, Yam JW, Ng IO: **Deleted in liver cancer 1 (DLC1) negatively regulates Rho/ROCK/MLC pathway in hepatocellular carcinoma.** *PLoS One* 2008, **3**(7):e2779.
18. Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H: **Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(7):2632–2641.
19. Guan R, Xu X, Chen M, Hu H, Ge H, Wen S, Zhou S, Pi R: **Advances in the studies of roles of Rho/Rho-kinase in diseases and the development of its inhibitors.** *Eur J Med Chem* 2013, **70**:613–622.
20. Lock FE, Ryan KR, Poulter NS, Parsons M, Hotchin NA: **Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2.** *PLoS One* 2012, **7**(2):e31423.
21. Rath N, Olson MF: **Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy.** *EMBO Rep* 2012, **13**(10):900–908.
22. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K: **Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity.** *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010, **67**(9):545–554.
23. Gurkar AU, Chu K, Raj L, Bouley R, Lee SH, Kim YB, Dunn SE, Mandinova A, Lee SW: **Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress.** *Nat Commun* 2013, **4**:2189.
24. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Hanamatsu T, Yoshioka T, Okano Y, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H: **Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells.** *Mol Cancer* 2011, **10**:79.
25. Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, De M, Maia B, Stiepcich MM, De Carvalho FM, Baiocchi G, Soares FA, Rocha RM: **Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV.** *Br J Cancer* 2013, **109**(1):184–194.
26. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
27. Diskin SJ, Eck T, Greshock J, Mosse YP, Naylor T, Stoeckert CJ, Weber BL, Maris JM, Grant GR: **STAC: A method for testing the significance of DNA copy number aberrations across multiple array-CGH experiments.** *Genome Res* 2006, **16**:1149–1158.
28. Silveira SM, Villacis RAR, Marchi FA, Barros Filho MC, Drigo AS, Scapulatempo Neto C, Lopes A, Cunha IW, Rogatto SR: **Genomic signatures predict poor outcome in undifferentiated pleomorphic sarcomas and leiomyosarcomas.** *PLoS One* 2013, **8**(6):e67643.
29. De Melo MB, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, De Brot L, Baiocchi G, Stiepcich MM, Soares FA, Rocha RM: **EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity.** *Human Pathol* 2014, **45**(5):917–925.
30. Brustmann H: **Epidermal growth factor receptor is involved in the development of an invasive phenotype in vulvar squamous lesions, but is not related to MIB-1 immunoreactivity.** *Int J Gynecol Pathol* 2007, **26**(4):481–489.
31. Mali RS, Ramdas B, Ma P, Shi J, Munugalavada V, Sims E, Wei L, Vemula S, Nabinger SC, Goodwin CB, Chan RJ, Traina F, Visconte V, Tiu RV, Lewis TA, Stern AM, Wen Q, Crispino JD, Boswell HS, Kapur R: **Rho kinase regulates the survival and transformation of cells bearing oncogenic forms of KIT, FLT3, and BCR-ABL.** *Cancer Cell* 2011, **20**(3):357–369.
32. Sahai E, Olson MF, Marshall CJ: **Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility.** *EMBO J* 2001, **20**(4):755–766.
33. Hosono Y, Yamaguchi T, Mizutani E, Yanagisawa K, Arima C, Tomida S, Shimada Y, Hiraoka M, Kato S, Yokoi K, Suzuki M, Takahashi T: **MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis.** *EMBO J* 2012, **31**(2):481–493.
34. Li G, Liu L, Shan C, Cheng Q, Budhraj A, Zhou T, Cui H, Gao N: **RhoA/ROCK/PTEN signaling is involved in AT-101-mediated apoptosis in human leukemia cells in vitro and in vivo.** *Cell Death Dis* 2014, **5**:e998.
35. Li GB, Cheng Q, Liu L, Zhou T, Shan CY, Hu XY, Zhou J, Liu EH, Li P, Gao N: **Mitochondrial translocation of cofilin is required for allyl isothiocyanate-mediated cell death via ROCK1/PTEN/PI3K signaling pathway.** *Cell Commun Signal* 2013, **11**:50.
36. Keniry M, Parsons R: **The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy.** *Oncogene* 2008, **27**:5477–5485.
37. Sahai E, Marshall CJ: **Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis.** *Nat Cell Biol* 2003, **5**(8):711–719.
38. Nakayama M, Amano M, Katsumi A, Kaneko T, Kawabata S, Takefuji M, Kaibuchi K: **Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration.** *Genes Cells* 2005, **10**(2):107–117.
39. Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Leuchter RS, Moore JG: **Management of Regional Lymph Nodes and Their Prognostic Influence in Vulvar Cancer.** *Obstet Gynecol* 1983, **61**(4):408–412.
40. Shi J, Wei L: **Rho kinase in the regulation of cell death and survival.** *Arch Immunol Ther Exp* 2007, **55**(2):61–75.
41. Orlando KA, Stone NL, Pittman RN: **Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells.** *Exp Cell Res* 2006, **312**(1):5–15.
42. Tanaka F, Kawano Y, Li M, Takata T, Miyahara R, Yanagihara K, Ohtake Y, Fukuse T, Wada H: **Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 1999, **17**(9):2728–2736.
43. Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousset S: **Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer.** *Cancer Res* 2002, **62**(21):6240–6245.
44. Kroiss A, Vincent S, Decaussin-Petrucci M, Meugnier E, Viallet J, Ruffion A, Chalmel F, Samarut J, Allioni N: **Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through downregulating ROCK1 and ROCK2.** *Oncogene* 2014. doi:10.1038/onc.2014.222. [Epub ahead of print].
45. Shin JY, Kim YI, Cho SJ, Lee MK, Kook MC, Lee JH, Lee SS, Ashktorab H, Smooy DT, Ryu KW, Kim YW, Chhoi IJ: **MicroRNA 135a suppresses lymph node metastasis through down-regulation of ROCK1 in early gastric cancer.** *PLoS One* 2014, **9**(1):e85205.
46. Xu X, Li S, Lin Y, Chen H, Hu Z, Mao Y, Xu X, Wu J, Zhu Y, Zheng X, Luo J, Xie L: **MicroRNA 124-3p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer cells by targeting ROCK1.** *J Trans Med* 2013, **11**:276.

doi:10.1186/1471-2407-14-822

Cite this article as: Akagi et al.: ROCK1 as a novel prognostic marker in vulvar cancer. *BMC Cancer* 2014 **14**:822.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 5 – Artigo em fase de revisão referente a projeto paralelo desenvolvido durante o período de doutorado.

S100A7 and S100P expression as potential prognostic marker for vulvar carcinomas

Lavorato-Rocha, AM¹ and Botelho, MCS²; Rodrigues, IS¹; Carvalho, KC; Puga, R⁴; de Melo Maia, B¹; Baiocchi, G³; Soares, FA²; Sato-Kuwabara, Y² and Rocha, RM¹

1 Molecular Morphology Laboratory – A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo - Brazil

2 Department of Anatomic Pathology – A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo - Brazil,

3 Department of Gynecology Oncology – A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo - Brazil,

4, Hospital Albert Einstein, São Paulo - Brazil

Corresponding author:

***Rafael Malagoli Rocha**

A.C.Camargo Cancer Center - Department of Anatomic Pathology

Rua Antônio Prudente 211

01509-900. São Paulo, SP, Brazil

Mobile phone: +55 (11)963978917

Rocha RM - rafael.malagoli@gmail.com

ABSTRACT

A large number of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) patients present metastatic disease at diagnosis that imposes a significant worse prognosis for these patients. Therefore, a wide coverage methodology that covers gene expression associated with tumor invasion islets may bring a greater understanding of the mechanisms that lead to worse tumor behavior and also to select those which may have prognostic impact for the VSCC patients. In this study, we microdissected and compared by GWE five frozen tissues of VSCC, comparing central tumor and invasion front of each of the tumors. Subsequently, several members of S100 members were selected for validation by immunohistochemistry and two (S100A7 and S100P) appeared as promising tumor markers for VSCC. S100P was more expressed in the front in comparison with the central tumor. Central area increased staining was associated with SCC3 and basaloid tumors and with less stromal invasion. S100P high staining in the invasion front was associated with more undifferentiated tumors. Additionally, CSS demonstrated that greater S100P in the invasion front associates with worse outcome for VSCC patients. S100A7 staining showed that it was less expressed on cases with tumor invasion and lymph node metastasis. Furthermore, both proteins had concomitant expression patterns in the front of invasion areas. In conclusion, the most important observation seen in the present study is the association between the higher levels of S100P and poor prognosis. This data clearly indicate that S100P is a promoting factor in the disease progression of VSCC and is a potential prognostic indicator which needs to be further investigated.

KEYWORDS: S100P, S100A7, microdissection, VSCC

INTRODUCTION

Vulvar cancer is a relatively uncommon disease, accounting for 3-5% of female genital-tract malignancies and the vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) represents >90% of malignant this tumors. (Canavan TP and Cohen D. 2002; Del Pino M. et al. 2013). Two different causes for vulvar carcinoma has been described: differentiated (keratinizing) type that is the most common and occurs in older women probably associated with p53 mutations and the classic type that is predominantly found in younger women due to high risk HPV infections (Dittmer C. et al. 2012; Carter JS. et al. 2012; Fuh KC. et al. 2012; Joura EA. et al. 2000).

VSCC has considerably risen over the past 40 years (Dittmer C. et al. 2012); however, the lack of visibility still makes its treatment mostly a mutilating surgical procedure witch is associated with high morbidity and psychosexual impairment (Woelber L. et al. 2011; Deppe G. et al. 2013; de Melo Maia B. et al. 2012a). Positive lymph nodes in the groin or femoral area, depth of invasion and diameter of the tumor, still the most important prognostic factor (Canavan TP and Cohen D. 2002; Dittmer C. et al. 2012). Therefore, attempts to improve VSCC prognostication and treatment modalities have been carried out with several isolated molecular markers (Knopp S. et al. 2009; Lavorato-Rocha AM. et al. 2013; Rodrigues IS. et al. 2013). However, this disease have been shown a complex molecular pattern, with several conflicting results (Lavorato-Rocha AM. et al. 2013; de Melo Maia B. et al. 2012b) making wide coverage methodologies a good approach for the

selection of particular molecules that might have been underestimated for this tumor.

In the past years, some studies evaluated VSCC signature using wide coverage methodologies such as comparative genomic hybridization (Allen et al 2002; Bryndorf et al 2004; Raitanen et al 2004; Huang et al 2005; Micci et al 2013), Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (Kunjoonju et al 2005), methylation specific-MLPA (Stephen et al 2009) and genomewide expression (GWE) (Micci et al 2013). These studies brought to light several new potential genes and pathways possibly associated with VSCC; however none of them were capable of elucidate one of the greater causes of mortality of this type of cancer – its capacity to metastasize.

A large number of patients present metastatic disease at diagnosis and almost half of them will relapse (de Melo Maia et al 2012a; Santeufemia et al 2012). This characteristic imposes a significant worse prognosis for these patients and despite the remarkable advances in the main EMT markers on VSCC (Rodrigues et al 2013), the process of invasion and metastasis still have a vast field to be evaluated. Therefore, a wide coverage methodology that covers gene expression associated with tumor invasion islets may bring a greater understanding of the mechanisms that lead to worse tumor behavior and also to select those witch may have prognostic impact for the VSCC patients. In this study, we microdissected and compared by GWE five frozen tissues of VSCC, comparing central tumor and invasion front of each of the tumors. Subsequently, several members of S100 members were

selected for validation by immunohistochemistry and two (S100A7 and S100P) appeared as promising tumor markers for VSCC.

Methodology

Sample Selection

Five VSCC fresh frozen tissues from patients that underwent surgical procedure into AC Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil) were rescued from the institutional Biobank and further sliced with 10µm thick and fixed into slides. These slides were maintained into -80°C and further used for genomewide expression array (GWE) analysis. Also, sixty-six formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) cases of VSCC from the Anatomic Pathology Department of the same institution were selected for immunohistochemical (IHC) evaluation. All samples had their HPV status previously reported (Lavorato-Rocha AM et al. 2013; de Melo Maia B. et al. 2012b; Rodrigues IS. et al. 2013). All cases were H&E-stained and reviewed by experienced pathologists to confirm the previous diagnosis. Clinical and follow-up information were obtained from their medical records up to 5 years after diagnosis for all patients.

Tissue microdissection

Each slide was stained with fast-H&E and introduced into Laser capture microdissection (LCM) equipment where they were quickly evaluated by an experienced pathologist. The same observer proceeded the laser pulses into the specific tumoral areas of interest (central tumor and front of invasion). For

each region microdissected, at least 1500 pulses were used to guarantee the minimum amount of material to extract total RNA. The CapSure Arcturus LCM (Applied Biosystems, Foster City, USA) were used to collect the material from the microdissection system from each region of interest of each of the samples evaluated. Importantly, the concept of front of invasion and central tumor areas in VSCC was previously published by Rodrigues et al (2013).

RNA extraction, amplification and GWE procedures

The caps containing the microdissected samples had their RNA extracted using PicoPure® RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and followed the manufacturers procedure. The total RNA extracted were then amplified using Arcturus® RiboAmp® HS PLUS Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and stained using Two-color microarray-based gene expression analysis (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA) and Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA). Briefly, the spike A and B from Low Input Quick Amp Labeling Kit were added to the samples (Spike A for front of invasions samples and Spike B for central tumor samples) during the first incubation with Primer 1 (65°C for 5min). The remaining steps of Round 1 along with the first and second strand amplification of Round 2 of amplification followed strictly the Arcturus® RiboAmp® HS PLUS Amplification Kit protocol. The Round 2 in-vitro transcriptional step was substituted by the Transcription Master Mix of Low Input Quick Amp Labeling Kit protocol and used 0.125µl of RNase Free Water, 4.8µl of 5xTranscription Buffer, 0.1µl of DTT 1.5µl NTP Mix, 0.315µl of

T7 RNA polymerase Blend and 0.36µl Cy3/Cy5 for each sample (40°C for 2hours). The mix that contained Cy3 was added to the samples obtained from front of invasion and the Cy5 Mix was used for those of central tumor areas. The remaining procedure followed strictly the Low Input Quick Amp Labeling Kit protocol. Gene expression profile was then evaluated by SurePrint G3 Human GE 8x60k Microarray platform (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA). All the slides were scanned at DNA microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA) and the data was extracted by Feature Extraction v 11.0.1.1 software (Agilent Technologies®, Santa Clara, USA) using bilt37.

Expression data were evaluated using Rank products methodology (Breitling R. et al. 2004). The significantly altered genes were submitted to an *in silico* functional analysis performed in KOBAS 2.0 (Xie et al. 2011).

Immunohistochemistry

Four-micrometer-thick FFPE whole-tissue sections from each case was placed on StarFrost® slides. All reactions used Advance Kit Protocol (DAKO, Carpinteria, USA). Briefly, the slides were deparaffinized in 3 xylene baths for 5min each, rehydrated in 3 baths of absolute alcohol, and rinsed in running water for 5 min. Antigen recovery was performed using a high-pH (9.0) solution of Tris-EDTA in a pressure cooker (DAKO, Carpinteria, USA) for 15min, then the slides were cooled at room temperature, and washed in water for 5min. Endogenous peroxidase activity was blocked with H₂O₂ (10

volumes: Rioquímica, Manaus, AM, Brazil) and rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) 3 times for 5min each.

Each slide was then incubated with anti-S100P monoclonal antibody (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) at a 1:100 dilution, anti-S100A7 monoclonal antibody (LSBio, LifeSpan BioScience, Seattle, USA) at a 1:150, anti-S100A8/A9 monoclonal antibody (Novus Biological, Littleton, USA) at a 1:100 and with anti-S100A12 monoclonal antibody (LSBio, LifeSpan BioScience, Seattle, USA) at a 1:150 for 2 hours at room temperature followed by 3 rinses with PBS. The signals were visualized with the ADVANCE HRP system (Dako, Carpinteria, CA, USA). The slides were incubated with post-primary antibody and polymer for 30min each and rinsed 3 times with PBS after each reagent. Then, diaminobenzidine (DAB), diluted in substrate buffer (1:50), was applied for 5 min and washed-off for 5min in running water. The slides were counterstained with hematoxylin for 1min, washed in water for 5min, and dehydrated in 3 baths of alcohol and 3 baths of xylene. The samples were mounted with coverslips using Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany) permanent medium. Positive and negative control slides were used to ensure credibility of the staining reaction.

All slides were digitalized on Pannoramic SCAN (3DHISTECH, Ltd, Budapest, Hungary) and had their areas of interest selected using Pannoramic View. Three areas were selected from the center and ten areas select from the front, according to a previously described method (Rodrigues et al 2013). Based on the algorithm HistoQuant of Panoramic View software

we were able to extract a Hscore of each area, that was used for obtain a median value for each area of each case.

Statistics

Median values of HScore of central tumor and invasion front areas of each case were used to calculate statistical relevance of S100P and S100A7 IHC staining. Kolmogorov-smirnov test was used to evaluate the normality of the variables and subsequently T-test and Mann-whitney test were used to compare IHC data with clinical and pathological variables and T-paired test to for front of invasion and central tumor association. Pearson test was used to evaluate the correlation between these proteins and their expression in both areas evaluated. Disease-free (DFS) and cancer-specific survival (CSS) rates were calculated using Kaplan–Meier method based on a follow-up of 5 years for all patients included in this study and relative risk was calculated using the log rank test. For these analysis the samples were categorized into 3 groups that were calculated based in the median HScore of central area that was used as cut-off for both areas evaluated: Group 1 – Both central tumor and front of invasion were concomitant higher or lower than the median; Group 2 – Central tumor had HScore higher than the median while invasion front had lower values; Group 3 – Invasion front had HScore higher than the median while central tumor had lower values. All statistical calculations were performed in SPSS 17.0 statistical software (Upper Saddle River, NJ, USA) using as confidence interval $p \leq 0.05$.

RESULTS

The age of the patients ranged from 30 to 98 years, being 66 the mean age. Most patients were caucasians (85.1%) and a little more than half of them did not presented HPV infection (51.5%). Among those 32 HPV infected tumor samples HPV16 and/or HPV18 were present in 50% of them. Fifty-two (78.8%) of the tumors evaluated were classified differentiated tumors (verrucous, squamous cell carcinoma grade 1 (SCC1) and/or squamous cell carcinoma grade 2 (SCC2) and the remaining tumors were classified as undifferentiated (squamous cell carcinoma grade 3 (SCC3), basaloid and sarcomatoid tumors). Vascular and lymphatic invasion were present in 16.4% and 9.8% of VSCC, respectively. Lymph node metastasis was observed in 42.9% of the samples and most of the patients (60%) were classified into early FIGO stages (FIGO I and II).

The GWE evaluation resulted in 69 genes significantly up-regulated in the front of invasion compared to the central tumor (**TABLE 1**). All genes were ranked and an *in silico* evaluation was performed using KOBAS 2.0 software that showed 372 pathways and 37 diseases significantly associated with these genes. Among the diseases, *skin diseases* were recurrent in the analysis, including skin cancer ($p=0.014$). Additionally, pathways associated with cellular differentiation ($p<0.001$), cell migration ($p=0.005$) and cell motility ($p=0.008$).

Based on gene expression five S100 family members (S100A7, S100A8, S100A9, S100A12 and S100P) appeared greatly enhanced; therefore, they

were selected for further evaluation also based on their potential relevance in some the pathways enriched by *in silico* functional analysis.

The proteins S100A8, S100A9 and S100A12 were discharged of the evaluation since after series of attempts to standardize them only the immune cells that surrounded and permeated the tumor area stained, probably due the intense inflammatory response in VSCC cancer areas.

S100P immunostaining was positive, cytoplasmic and had heterogeneous intensity in all tumor extensions (**FIGURE 1**). S100P was more expressed in the front in comparison with the central tumor ($p<0.001$) The central area increased staining was associated with SCC3 and basaloid tumors ($p<0.001$) and with less stromal invasion ($p=0.044$). The same pattern was observed in the invasion front when associated with more undifferentiated tumors ($p<0.001$) (**TABLE 2**). Additionally, CSS demonstrated that greater S100P in the invasion front associates with worse outcome for VSCC patients ($p=0.002$) and DFS failed to associate with this protein expression (**FIGURE 2**).

Immunostaining of S100A7 had similar pattern of staining than S100P (**FIGURE 1**) and had no difference of expression between the invasion front and the central tumor ($p=0.146$). Associations between protein expression and clinical-pathological variables demonstrated S100A7 less expressed on cases with tumor invasion and lymph node metastasis ($p=0.048$ and $p=0.044$, respectively) (**TABLE 3**). This protein expression had no association with CSS and DFS (**FIGURE 2**).

Both proteins evaluated had no expression correlation in the central tumor area ($r^2=0.009$ - $p=0.957$); however, they had concomitant expression patterns in the front of invasion areas ($r^2=0.324$ – $p=0.036$).

DISCUSSION

This study intended to present relevant prognostic markers for tumor invasion, and maybe to prevent the high rate of metastasis that occurs in VSCC. However, S100 family, that appeared as promising markers for this evaluation does not apply for the requisites firstly thought since only two stained in tumor areas and none of them associated with grater invasion or recurrences. Instead, we observed a new rising role of S100p in prognosticating VSCC.

S100P pattern of staining was heterogeneous – predominantly cytoplasmic – in the VSCC cases evaluated as expected by previous reports that associated to several intra and extracellular roles. In the extracellular compound, it acts to activate signal transduction pathways (Arumugam T et al. 2004; Heizmann CW. et al. 2007) and to promote tumor development (Fuentes MK. et al. 2007). In intracellular space, it promotes cytoskeleton disruption that leads to cell migration and to cell proliferation (Austermann J. et al. 2008). In the VSCC tumors, S100P was significantly more expressed in IF islets, similar to Yuan et al. (2013) findings in hepatocellular carcinomas. However, the enhance invasiveness capacity associated with higher S100P expression was not observed in CT and IF as seen in hapatocellular

carcinoma (Yuan et al. 2013), breast cancer (Maierthaler et al. 2015) and pancreatic cancer (Hu et al. 2014). Instead, CT presented higher levels of S100P associated with more superficial tumors, suggesting a non-expected pattern of expression. However, as hypothesized by McKiernan et al. (2011) some of S100 family are cell context dependents; therefore, in CT areas its capacity to enhance tumor progression might be suppressed. On the other hand, undifferentiated tumors were associated with increased S100P staining that confirm most of the previous findings that associated S100P with tumor progression (Basu GD. et al. 2008).

The other member of S100 family evaluated also presented heterogeneous pattern of staining; however, S100A7 did not show any difference between IF and CT tumor areas. Possibly it might occur by the same mechanism that invalidated the remaining S100 family members described by GWE evaluation. The proteins of S100 family mediates Ca²⁺-dependent signal transduction and play important roles in regulation of gene transcription, protein phosphorylation, enzyme activation, the assembly of cytoskeleton components, cell differentiation and proliferation (Jiang H. et al. 2012). Also, they have a well described role in inflammatory response (Webb M. et al. 2005; Leon R. et al. 2007; Tripathi SC. et al. 2010). In this context, the lack of correspondence of S100A7 together with S100A8, S100A9 and S100A12 with tumor characteristics and prognosis may be linked to the extreme sensitivity associated with the methodology used for GWE. Microdissection by laser is an outstanding methodology that provides samples with a high grade of purity in most of the cases. However, it may also provide

interference greater than expected. In this study, the IF areas were very small - accounting for 5 to 20 cells – therefore, some of the islets microdissected might be contaminated with inflammatory cells that were impossible to recognize due to the quick HE staining used to preserve the RNA. Thereby, a single inflammatory cell contamination might produce a large interference since series of RNA amplification were performed for each sample. This, along with the several steps that mRNA pass to codify a protein, may have contributed to others S100 overexpression in GWE and no correspondence in IHC.

Even though S100A7 did not fulfill its initial intention it was carefully evaluated and revealed a contradictory but less impacting role than S100p. S100A7 is distributed in the cytoplasm of keratinocytes in normal human epidermis and is present at the cell periphery in terminally differentiated keratinocytes [18]. Increased S100A7 expression has been reported in several epithelial malignancies such as, in situ ductal breast carcinoma, lung, bladder, skin, esophageal, gastric and head and neck cancers (Celis JE. et al. 1996; Al-Haddad S. et al. 1999; El-Rifai W. et al. 2002; Ji J. et al. 2004; Moubayed N. et al. 2007; Zhang H. et al. 2008; Tripathi SC. et al. 2010). Our study did not intended to determinate whether S100A7 was higher in normal or pre-malignant lesions than in tumoral tissue; therefore, it was not possible to evaluate some of the previously reported roles of this protein in carcinogenesis. However, the potential invasion role was not confirmed for vulvar carcinoma since neither IF nor CT were associated with tumor invasion. Also, none of them had this protein expression associated with

disease free survival, demonstrating that for VSCC this protein does not seem to be relevant as it appears to be for head and neck squamous cell carcinomas (Tripathi SC. et al. 2010). Conversely, high S100A7 staining associated with less vascular invasion and less lymph node metastasis that contradicts most of the S100A7 knowledge published so far. However, Deol et al. (2011), showed by an *in vitro* and *in vivo* assay that S100A7 was associated with less invasion, migration and metastasis in ER+ breast tumors. They suggested that S100A7 was disrupting β -catenin pathway by activation of GSK3 β phosphorylation activity. Therefore, we evaluated whether EMT was associated with S100A7 based on a previous study of our group (Rodrigues IS. et al 2013). This comparison failed to achieve statistical significance. Thus, we propose that S100A7 is not critical for EMT, at least for the previously investigated proteins in VSCC; however, it might act in some manner that remains to be completely understood and warrants further investigation.

In conclusion, the most important observation seen in the present study is the association between the higher levels of S100p and poor prognosis. This data clearly indicate that S100p is a promoting factor in the disease progression of VSCC and is a potential prognostic indicator which needs to be further investigated.

TABLES AND FIGURES

Table 01 - List of sixty selected genes based on genome-wide expression evaluation by Rank products methodology.

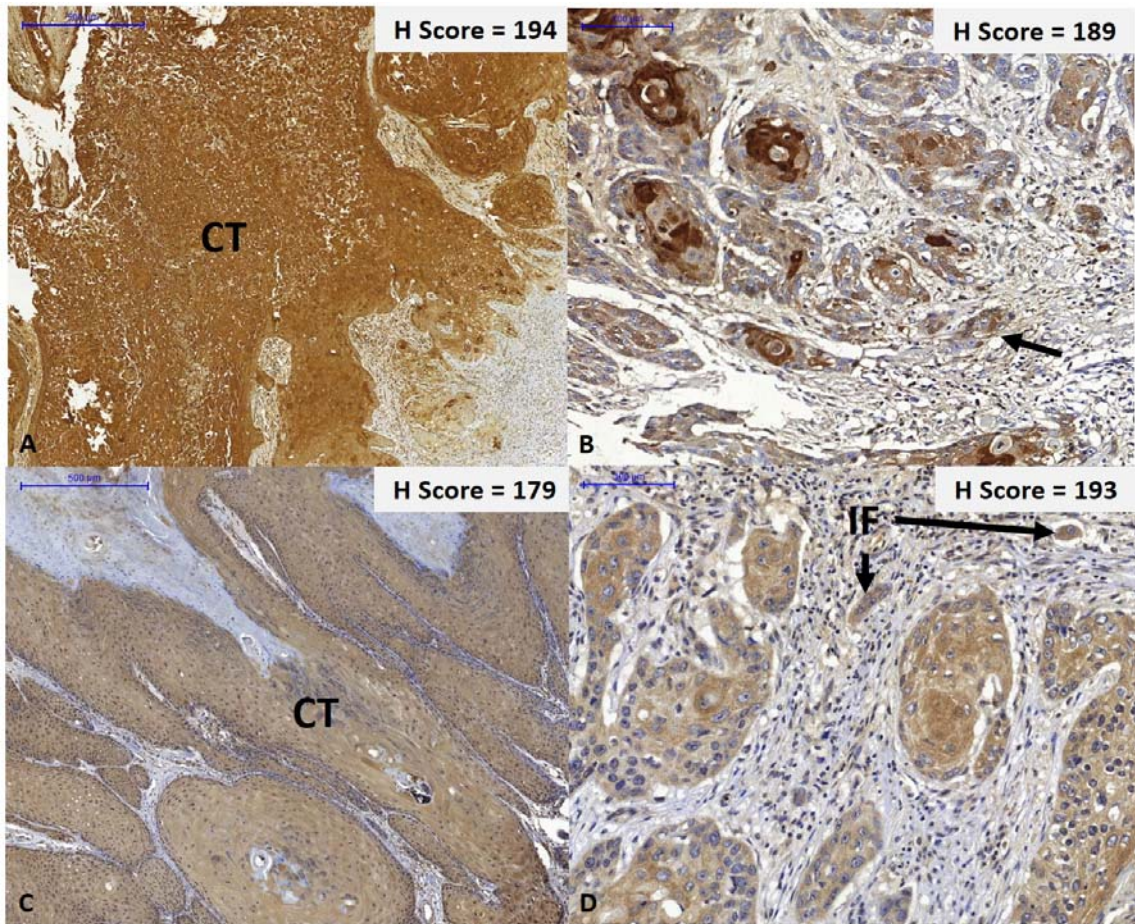
Symbol	Transcript	ProbeName
CEACAM1	NM_001712	A_24_P382319
H3F3A	NM_002107	A_32_P208424
LCE2C	NM_178429	A_23_P63521
SMPD3	NM_018667	A_23_P163567
SLC35A5	NM_017945	A_23_P255057
LCE3E	NM_178435	A_33_P3264179
CNFN	NM_032488	A_33_P3411848
KRT80	NM_182507	A_24_P331704
DSTN	NM_001011546	A_23_P408095
CALML5	NM_017422	A_33_P3339865
SPRR2A	NM_005988	A_33_P3260426
DEFB4A	NM_004942	A_23_P157628
CST6	NM_001323	A_23_P146946
TGM1	NM_000359	A_23_P65618
SPNS2	NM_001124758	A_24_P8371
IL36G	NM_019618	A_23_P17053
S100A12	NM_005621	A_33_P3385785
IL20RB	NM_144717	A_23_P91850
LOC645638	NR_030732	A_21_P0009342
IL1RN	NM_173843	A_33_P3246833
ANXA1	NM_000700	A_23_P94501
KLK7	NM_005046	A_23_P39056
LYPD5	NM_182573	A_24_P323148
MPZL2	NM_005797	A_33_P3215948
CD24	NM_013230	A_33_P3369844
EGLN3	NM_022073	A_33_P3256952
EPS8L1	NM_133180	A_33_P3220698
PCDH1	NM_002587	A_33_P3349637
SERPINB13	NM_012397	A_33_P3279019
SPRR2G	NM_001014291	A_33_P3334423
TMEM45A	NM_018004	A_33_P3344831

PLA2G4D	NM_178034	A_33_P3361611
TMPRSS11B	NM_182502	A_33_P3318097
APOBEC3A	NM_145699	A_32_P9543
LANCL3	NM_198511	A_33_P3391375
ASPRV1	NM_152792	A_23_P417383
RNF222	NM_001146684	A_33_P3318449
TMPRSS11D	NM_004262	A_33_P3374678
S100P	NM_005980	A_23_P58266
S100A9	NM_002965	A_23_P23048
NCCRP1	NM_001001414	A_33_P3411477
SPRR1A	NM_005987	A_23_P74012
S100A7	NM_002963	A_23_P103310
SFN	NM_006142	A_33_P3389286
KRTDAP	NM_207392	A_23_P90453
SMIM5	NM_001162995	A_33_P3247057
SERPINB4	NM_002974	A_23_P502413
SPRR3	NM_005416	A_23_P62709
C9orf169	NM_199001	A_33_P3232504
S100A12	NM_005621	A_23_P74001
SPINK5	NM_006846	A_23_P356494
CDSN	NM_001264	A_23_P350396
KRT23	NM_015515	A_23_P78248
SERPINB3	NM_006919	A_23_P55632
LCE3D	NM_032563	A_23_P115519
SLC15A1	NM_005073	A_33_P3373273
CRCT1	NM_019060	A_33_P3401295
SBSN	NM_001166034	A_33_P3269636
KLK6	NM_001012964	A_33_P3235940
SPRR2B	NM_001017418	A_33_P3247431
KRT10	NM_000421	A_23_P49975
KPRP	NM_001025231	A_33_P3312519
SPRR2D	NM_006945	A_23_P11644
FLG	NM_002016	A_32_P387648
SPRR2C	NR_003062	A_23_P126089
SPRR2A	NM_005988	A_33_P3260430
SPRR2F	NM_001014450	A_33_P3274811
S100A8	NM_002964	A_23_P434809
SPRR2E	NM_001024209	A_33_P3325704

Table 02 – Proteins S100P and S100A7 association with clinocopathological variables in central tumor and invasion front areas.

	S100P				S100A7			
	CT		IF		CT		IF	
	Mean	p	Mean	p	Mean	p	Mean	p
Diagnosis								
SCC1-2	105,66	,000	93,35	,000	138,08	,052	152,07	,398
SCC3-basaloid	116,06		153,80		158,09		163,09	
Depth of invasion								
Medial and superficial	116,98	,044	134,94	,485	147,73	,391	161,65	,261
Subcutaneous	101,72		127,85		139,84		149,41	
Inflammatory invasion								
Absent/low	112,78	,913	129,87	,083	137,56	,089	155,01	,957
Moderate/high	114,14		166,53		165,98		154,23	
Vascular invasion								
Absent	113,69	,394	132,11	,745	148,64	,048	157,69	,480
Present	105,85		127,54		127,60		148,83	
Perineural invasion								
Absent	113,01	,570	130,60	,601	142,00	,491	154,78	,983
Present	106,52		120,87		134,65		154,48	
Lymph node metastasis								
Absent	112,15	,807	129,65	,686	141,58	,044	162,99	,202
Present	110,16		137,75		123,62		141,14	
HPV infection								
Absent	114,80	,518	130,61	,770	141,44	,729	150,74	,450
Present	110,48		133,77		144,55		158,90	
High-risk HPV								
Absent	114,68	,361	131,26	,818	141,89	,720	151,16	,326
Present	107,92		134,04		145,55		162,86	
EMT								
Absent	105,00	,096	145,95	,619	132,17	,950	164,43	,852
Present	128,28		137,13		131,37		159,16	

CT – central tumor; IF – invasion front; SCC – Squamous cell carcinoma; HPV – Human papilloma virus; EMT – epithelial to mesenchymal transition



S100A7: Central tumor area (CT) – A; invasion front area (IF): B - S100P:
Central tumor area (CT) – C; invasion front area (IF): D

Figure 1 – Immunohistochemistry staining pattern of S100P and S100A7 in central tumor and invasion front areas.

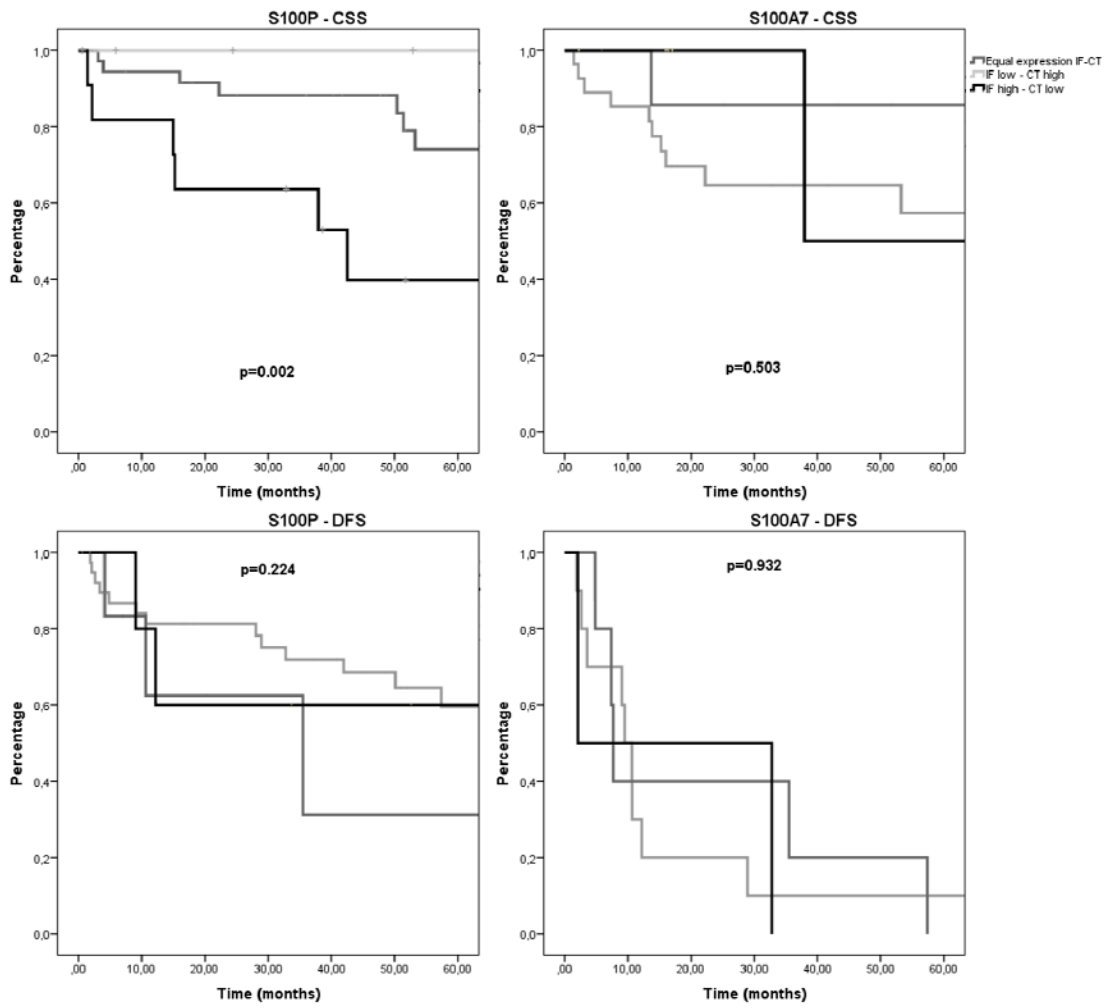


Figure 2 – Cancer specific survival and disease free survival associated with S100P and S100A7 expression.

REFERENCES

Canavan TP and Cohen D. Vulvar Cancer. *Am Fam Physician* 2002; 1;66(7):1269-1275

Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2013, 62 161–175.

Dittmer C, Fischer D, Diedrich K, Thill M. Diagnosis and treatment options of vulvar cancer: a review. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 285(1):183-93

Carter JS, Downs LS Jr. Vulvar and Vaginal Cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012; 39(2):213-31.

Fuh KC, Berek JS. Current Management of Vulvar Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012; 26(1):45-62.

Joura EA, Losch A, Haider-Angeler MG, Breiteneker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med.* 2000;45:613–5

Woelber L, Kock L, Giesecking F, Petersen C, Trillsch F, Choschzick M, Jaenicke F, Mahner S. Clinical management of primary vulvar cancer. *Eur J Cancer.* 2011; 47(15):2315-21.

Deppe G, Mert I, Belotte J, Winer IS. Chemotherapy of vulvar cancer: a review. *Wien Klin Wochenschr.* 2013; 125(5-6):119-28.

a - 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.* 2012;75(1):53-60.

Knopp S, Tropè C, Nesland JM, Holm R. A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. *J Clin Pathol.* 2009;62(3):212-8.

Lavorato-Rocha AM, de Melo Maia B, Rodrigues IS, et al. Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(1):31-9.

Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, de M Maia B, et al. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV. *Br J Cancer.* 2013;109(1):184-94.

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

Huang FY, Kwok YK, Lau ET, Tang MH, Ng TY, Ngan HY. Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;157(1):42-8.

Bryndorf T, Kirchhoff M, Larsen J, Andreasson B, Bjerregaard B, Westh H, Rose H, Lundsteen C. The most common chromosome aberration detected by high-resolution comparative genomic hybridization in vulvar intraepithelial neoplasia is not seen in vulvar squamous cell carcinoma. *Cytogenet Genome Res.* 2004;106(1):43-8.

Allen DG, Hutchins AM, Hammet F, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridisation in vulvar cancers. *Br J Cancer.* 2002;86(6):924-8.

Raitanen M, Worsham MJ, Lakkala T, et al. Characterization of 10 vulvar carcinoma cell lines by karyotyping, comparative genomic hybridization and flow cytometry. *Gynecol Oncol* 2004;93(1):155-63.

Micci F, Panagopoulos I, Haugom L, et al. Genomic aberration patterns and expression profiles of squamous cell carcinomas of the vulva. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52(6):551-63.

Kunjoonju J.P. et al. Identification of individual genes altered in squamous cell carcinoma of the vulva. *Genes Chromosomes Cancer* 44: 185-193 2005

Santeufemia DA, Capobianco G, Re GL, Miolo GM, Fadda GM, Cherchi PL, Tumolo S. Cisplatin-gemcitabine as palliative chemotherapy in advanced squamous vulvar carcinoma: report of two cases. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012; 33: 421–422.

Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*. 2004 Aug 27;573(1-3):83-92

Xie, C., Mao, X., Huang, J., Ding, Y., Wu, J., Dong, S., Kong, L., Gao, G., Li, C. and Wei, L. (2011) KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res*, 39, W316-322

Arumugam T, Simeone DM, Schmidt AM, Logsdon CD. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 2004; 279: 5059–5065.

Heizmann CW, Ackermann GE, Galichet A. Pathologies involving the S100 proteins and RAGE. *Subcell Biochem*. 2007;45:93-138.

Fuentes MK, Nigavekar SS, Arumugam T, Logsdon CD, Schmidt AM, et al. RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1230–1240.

Austermann J, Nazmi AR, Müller-Tidow C, Gerke V. Characterization of the Ca²⁺-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration. *J Biol Chem* 2008; 283: 29331–29340

Yuan RH, Chang KT, Chen YL, Hsu HC, Lee PH, Lai PL, Jeng YM. S100P Expression Is a Novel Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma and Predicts Survival in Patients with High Tumor Stage or Early Recurrent Tumors. *PLoS One*. 2013 Jun 13;8(6)

Maiertaler M, Kriegsmann M, Peng C, Jauch S, Szabo A, Wallwiener M, Rom J, Sohn C, Schneeweiss A, Sinn HP, Yang R, Burwinkel B. S100P and HYAL2 as prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2015; 99(1):180-7.

McKiernan E1, McDermott EW, Evoy D, Crown J, Duffy MJ. The role of S100 genes in breast cancer progression. *Tumour Biol*. 2011; 32(3):441-50.

Basu GD, Azorsa DO, Kiefer JA, Rojas AM, Tuzmen S, Barrett MT, Trent JM, Kallioniemi O, Mousses S. Functional evidence implicating S100P in prostate cancer progression. *Int J Cancer*. 2008; 123(2):330-9.

Hu H, Zhang Q, Huang C, Shen Y, Chen X, Shi X, Tang W. Diagnostic value of S100P for pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014; 35(10):9479-85.

Jiang H, Hu H, Tong X, Jiang Q, Zhu H, et al. Calcium-binding protein S100P and cancer: mechanisms and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 1–9.

Webb M, Emberley ED, Lizardo M, Alowami S, Qing G, et al. Expression analysis of the mouse S100A7/psoriasin gene in skin inflammation and mammary tumorigenesis. *BMC Cancer* 2005; 5: 17

Leon R, Murray JI, Cragg G, Farnell B, West NR, et al. Identification and characterization of binding sites on S100A7, a participant in cancer and inflammation pathways. *Biochemistry* 2009; 48: 10591–10600

Tripathi SC1, Matta A, Kaur J, Grigull J, Chauhan SS, Thakar A, Shukla NK, Duggal R, DattaGupta S, Ralhan R, Siu KW. Nuclear S100A7 Is Associated with Poor Prognosis in Head and Neck Cancer. *PLoS One*. 2010; 3;5(8):e11939

Celis JE, Rasmussen HH, Vorum H, Madsen P, Honore B, et al. Bladder squamous cell carcinomas express psoriasin and externalize it to the urine. *J Urol* 1996; 155: 2105–2112

Al-Haddad S, Zhang Z, Leygue E, Snell L, Huang A, et al. Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 2057–2066.

El-Rifai W, Moskaluk CA, Abdrabbo MK, Harper J, Yoshida C, et al. Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. *Cancer Res* 2002; 62: 6823–6826

Ji J, Zhao L, Wang X, Zhou C, Ding F, et al. Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 480–486

Moubayed N, Weichenthal M, Harder J, Wandel E, Sticherling M, et al. Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 253–261

Zhang H, Zhao Q, Chen Y, Wang Y, Gao S, et al. Selective expression of S100A7 in lung squamous cell carcinomas and large cell carcinomas but not in adenocarcinomas and small cell carcinomas. *Thorax* 2008; 63: 352–359

Deol YS., Nasser MW., Yu L., Zou X. and Ganju RK. Tumor-suppressive Effects of Psoriasin (S100A7) are mediated through the β -Catenin/T Cell Factor 4 Protein Pathway in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286 (52): 44845–44854