

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E
AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MICRORNAS EM
CARCINOMAS DE VULVA**

BEATRIZ DE MELO MAIA

**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. Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Maia, Beatriz de Melo

Caracterização do perfil de expressão e avaliação funcional de microRNAs em carcinomas de vulva / Beatriz de Melo Maia – São Paulo, 2016.

111p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. NEOPLASIAS VULVARES. 2. MICRORNAS 3. INFECÇÕES POR PAPILLOMAVÍRUS. 4. TÉCNICAS DE CULTURA DE CÉLULAS.

***“A vontade de Deus nunca irá levá-lo onde
a Graça de Deus não irá protegê-lo.”***

Francisco Cândido Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todos os que estiveram ao meu lado durante a trajetória do meu doutoramento e que me fizeram perseverar e chegar até aqui.

Dedico este trabalho também às mulheres que, ao longo de sua caminhada, se depararam com todo e qualquer câncer ginecológico.

AGRADECIMENTOS

Todo o agradecimento à Deus por me permitir chegar até aqui e não permitir que meus pés vacilassem pelo caminho. Nos momentos em que só via uma pegada na areia e acreditei estar andando sozinha, era Ele quem me carregava no colo.

Agradeço também à minha família pelo apoio incondicional. Minha mãe pelo exemplo de perseverança e por acreditar no meu potencial pleno. Meu pai por todo seu amor e apoio, mesmo à distância. Minha querida vovó Lúcia pelo seu auxílio carinhoso no silêncio. Muito obrigada.

À minha querida família chinesa por todo o carinho, em especial ao meu namorado, amor e companheiro por sua paciência e alegria. Sinto-me muito amada por vocês e este amor é recíproco. Xièxiè, jiāting!

Agradeço imensamente ao meu orientador, Dr Rafael Malagoli Rocha, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo por tantos anos, me proporcionando um crescimento pessoal e profissional inestimáveis.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e ao MD Anderson Cancer Center pelo acolhimento e pela FAPESP por todo apoio financeiro, tanto no Brasil (Processo 2011/18065-6) quanto no exterior (Proceso BEPE 2013/04075-5). Aqui deixo também meu agradecimento sincero ao Dr George Calin e todo seu laboratório por me receber e por compartilhar tamanho conhecimento.

Agradeço a todos os colegas do A.C.Camargo Cancer Center e do CIPE, em particular aos que participaram ativamente de nossas discussões científico-filosóficas durante esta trajetória. Agradeço também às amigas que fui colecionando ao longo do caminho, aqui e lá fora.

Aos departamentos de Patologia e Ginecologia do A.C.Camargo Cancer Center, e aos funcionários da Pós-Graduação, Biobanco, SAME, CEP e Biblioteca, por toda assistência.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todas as pacientes portadoras, curadas ou sucumbidas por tumores ginecológicos. Suas trajetórias pela doença foram carinhosamente cuidadas e, hoje, posso trazer algum tipo de retorno à elas.

RESUMO

Maia BM. **Caracterização do perfil de expressão e avaliação funcional de microRNAs em carcinomas de vulva.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O carcinoma de vulva é um tumor ginecológico raro, cuja escassez de informações biológicas torna veemente a necessidade de se identificar moléculas que possibilitem a compreensão dos mecanismos atuantes neste tipo de tumor, tais como os microRNAs, cuja expressão desregulada tem sido demonstrada com relevância na tumorigênese. **OBJETIVOS:** Realizar a caracterização do perfil de expressão de microRNAs em amostras de carcinomas de vulva na presença e ausência de HPVs de alto risco, correlacionar a expressão de microRNAs com características clinicopatológicas das pacientes, bem avaliar o papel destes microRNAs e seus alvos no câncer vulvar através de estudos funcionais. **MÉTODOS:** Quarenta amostras de carcinomas de células escamosas de vulva, sendo 20 amostras HPV positivas e 20 HPV negativas foram selecionadas para análise de expressão diferencial de microRNAs. Sete amostras de bordas normais foram utilizadas para a construção de um *pool* usado como controle não tumoral global. A identificação dos microRNAs diferencialmente expressos nas diferentes amostras foi realizada por qRT-PCR através do sistema de cartões *TaqMan human microRNA array 2.0 A+B*. Foi, ainda, realizada a busca *in silico* de possíveis alvos gênicos dos microRNAs diferencialmente expressos por meio do algoritmo MAGIA. MicroRNAs diferencialmente expressos em tumores HPV negativos foram correlacionados com dados clinicopatológicos importantes das pacientes e aqueles de potencial interesse tiveram sua atividade biológica avaliada por meio de ensaios celulares – proliferação, migração e invasão – em uma cultura de células de vulva (SW962), antes e após a transfecção de oligonucleotídeos miméticos destes microRNAs. Foi realizada, ainda, a avaliação da expressão gênica de um importante alvo de um destes microRNAs por qRT-PCR, e proteica por western blot e imunofluorescência. Finalmente, foi realizada a avaliação do alvo selecionado em

amostras parafinadas de dezoito pacientes e a expressão proteica destes alvos foi associada com dados clinicopatológicos. **RESULTADOS:** Foram observados 25 microRNAs diferencialmente expressos na comparação dos grupos de tumores HPV positivos *versus* HPV negativos; e 79 microRNAs na comparação entre tumores *versus* controle não tumoral. Uma rede de interação entre os perfis de expressão dos microRNAs diferencialmente expressos e mRNAs-alvo previamente descritos com relevância nos carcinomas de vulva foi obtida, como por exemplo, TP53, RB, PTEN e EGFR. A diminuição da expressão dos microRNAs miR-223-5p e miR-19-b1-5p foi associada com a presença de metástase linfonodal nas pacientes, enquanto a diminuição da expressão dos microRNAs miR-100-3p e, novamente, miR-19-b1-5p foi associada com a presença de invasão vascular; já o aumento de expressão dos microRNAs miR-519b e miR-133a associou-se com estadiamentos FIGO mais avançados. Em um segundo momento, miR-223-5p foi selecionado para as subsequentes análises *in vitro*. Quando adicionados miR-223-5p miméticos às células SW962 por meio de transfecção transiente, observou-se uma diminuição das taxas de proliferação ($p < 0.01$) e migração ($p < 0.001$) celulares e, em contrapartida, um aumento do potencial invasivo destas células ($p < 0.004$). Após cuidadosa análise *in silico* de potenciais alvos do miR-223-5p, TP63 foi selecionado e o miR-223-5p foi demonstrado por afetar a expressão de p63, tanto a nível de proteína quanto mRNA ($p < 0.001$ e $p < 0.0001$, respectivamente). Foi demonstrado, ainda, que a diminuição da expressão de p63 em amostras de pacientes foi associada com maior invasão tumoral ($p = 0.0345$) e menor sobrevida global ($p = 0.0494$). **CONCLUSÕES:** Nosso estudo demonstrou que microRNAs podem ser clinicamente importantes em carcinomas vulvares e que sua desregulação parece ser importante na carcinogênese vulvar. Além disso, nossos resultados mostram um microRNA em particular, miR-223-5p, como tendo papel importante na regulação de expressão gênica relacionada a valor prognóstico em carcinoma de vulva.

SUMMARY

Maia BM. [**Characterization of microRNA expression profiles and their functional evaluation in vulvar carcinomas**]. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Vulvar carcinoma is a rare gynecological tumor, and the lack of biological information regarding this tumor strongly incites the need to identify molecules that enable the understanding of the mechanisms acting in this type of tumor, such as microRNAs, which dysregulated expression has been demonstrated with relevance in tumorigenesis. **OBJECTIVES:** To characterize microRNA expression profile in vulvar carcinoma samples in the presence and absence of high-risk HPVs, to correlate the expression of microRNAs with clinicopathological characteristics of the patients and to evaluate the role of these microRNAs in vulvar cancer through functional studies. **METHODS:** Forty samples of squamous cell carcinoma of the vulva, being 20 positive and 20 negative for HPV were selected for the analysis of differentially expressed microRNAs. Seven samples of normal vulva were used for the construction of a non-tumor control. The identification of microRNAs differentially expressed between the samples was performed by qRT-PCR using *TaqMan human microRNA array 2.0 A+B*. Were also performed validation of the selected microRNAs using fresh-frozen tissue and an *in silico* search of potential target genes of these microRNAs through MAGIA algorithm. Differentially expressed microRNAs in the HPV negative tumor group were correlated with important clinicopathological data from patients and those of potential interest had their biological activity assessed by cellular assays – proliferation, migration and invasion – in a vulvar cell culture (SW962) before and after transfection with mimetic oligonucleotides of these microRNAs. We also performed the evaluation of gene expression of an important target of one of these microRNAs by qRT-PCR, and protein by western blot and immunofluorescence. Finally, protein expression of the selected target was evaluated on eighteen paraffined samples and the expression was associated with clinicopathological data

of the patients. **RESULTS:** There were 25 differentially expressed microRNAs in the comparison of HPV-positive *versus* HPV negative tumors group; and 79 microRNAs when comparing tumors versus normal samples. An interaction network between the expression profiles of the differentially expressed microRNAs and mRNAs target previously described with relevance in vulva carcinoma, such as TP53, RB, EGFR and PTEN was obtained. Downregulation of miR-223-5p, and miR-19-b1-5p were correlated with lymph node metastasis in patients, while the reduction of the expression of miR-100-3p, and again, miR-19-b1-5p were correlated with the presence of vascular invasion; overexpression of microRNA miR-133a and miR-519b were associated with advanced FIGO staging. In a second moment, miR-223-5p was selected for subsequent *in vitro* analysis. When miR-223-5p mimetics were added to SW962 cells by transient transfection, we observed a decrease of the proliferation rates ($p < 0.01$) and migration ($p < 0.001$), and in contrast, an increased invasive potential of these cells ($p < 0.004$). After a careful *in silico* analysis for potential targets of miR-223-5p, TP63 has been selected and was shown to be affected by the chosen microRNA, at both protein and mRNA level ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). It has been demonstrated also that a decreased expression of p63 in samples of patients was associated with increased tumor invasion ($p = 0.0345$) and shorter overall survival ($p = 0.0494$). **CONCLUSIONS:** Our study demonstrated that microRNAs may be clinically important in vulvar carcinomas and that their deregulation appears to be important in the vulvar carcinogenesis. Furthermore, our results demonstrate a particular microRNA, miR-223-5p, as having an important role on the regulation of genic expression related to a prognostic value in vulvar carcinomas.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1	Classificação dos carcinomas escamosos da vulva de acordo com o grau de diferenciação celular.....	5
Quadro 2	Estadiamentos TNM e FIGO para o carcinoma vulvar.....	13
Figura 1	Biogênese dos microRNAs.....	22
Figura 2	Desregulação de microRNAs.....	26
Figura 3	Delineamento experimental do projeto.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	Região 3' não traduzida (<i>untranslated region</i>)
5-FU	5-Fluorouracil
5S	5S RNA
AGO	Proteína Argonauta
AKT	Proteína cinase B (PKB)
ARTN	Artemina
BCL-2	Linfoma de células B 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
c-KIT	Oncogene do sarcoma viral felino v-kit Hardy-Zuckerman 4
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CCND3	Ciclina D3
CEC	Carcinoma de células escamosas
CDK2	Cinase dependente de ciclina 2
CDK6	Cinase dependente de ciclina 6
CDKN1A	Inibidor da cinase dependente de ciclina 1A, p21
CDKN2A	Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A
cDNA	DNA complementar
c-MYC	Proteína MYC celular
CO₂	Dióxido de carbono
CT	Limiar do ciclo de amplificação (<i>Cycle threshold</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DGCR8	Região do gene crítico da síndrome DiGeorge (<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>)
DMEM	Meio Dulbecco modificado por Eagle
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNMT3A	DNA metiltransferase 3A
DNMT3B	DNA metiltransferase 3B
DST	Doença sexualmente transmissível
E2F	Fator E2

E5	Proteína precoce do HPV 5
E6	Proteína precoce do HPV 6
E7	Proteína precoce do HPV 7
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Endo-siRNA	Pequenos RNAs de interferência endógenos
EXP5	Exportina 5
FDR	Taxa de detecção de falha (<i>False discovery rate</i>)
FFPE	Fixado em formalina, embebido em parafina (<i>Formalin-fixed paraffin embeded</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
HPV	Papilomavírus Humano
HRP	Peroxidase de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	Imunoglobulina G
IHC	Imunoistoquímica
LLC	Leucemia linfocítica crônica
lncRNA	RNAs longos não codificantes (<i>long non-coding RNAs</i>)
MAGIA	Ferramenta online “ <i>MiRNA and Genes Integrated Analysis</i> ”
miR	MicroRNA
miRNA	MicroRNA
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
MT1	Metaloproteinase de matriz de membrana tipo 1
Na3VO4	Ortovanadato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NANOG	Gene Nanog (<i>Nanog Homeobox</i>)
ncRNA	RNAs não codificadores
NIV	Neoplasia Intraepitelial Vulvar
NP-40	Tergitol
P	Valor de P

p14ARF	Supressor de tumor ARF
p63	Proteína p63
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
piRNA	RNAs que interagem com PIWI (<i>piwi-interacting RNAs</i>)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
pRB	Proteína do retinoblastoma
pre-miRNA	Precursor de microRNA
pri-miRNA	MicroRNA primário
PTEN	Fosfatase e homólogo de angiotensina
PVDF	Fluoreto de polinilideno
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RB1	Gene do retinoblastoma 1
RIPA	Tampão do ensaio de radioimunoprecipitação
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio do Instituto Roswell Park Memorial
SAM	Análise de significância de microarranjos (<i>Significance analysis of microarrays</i>)
SCC	Carcinoma de células escamosas
SD	Desvio Padrão
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio – Gel de poliacrilamida (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel</i>)
SEAP	Fosfatase alcalina secretada
SEPT6	Septina 6
siRNA	Pequenos RNAs de interferência (<i>small interfering RNA</i>)
TAp63	Domínio de transativação p63
Tis	Tumor <i>in situ</i>
TLDA	Cartão TaqMan de baixa densidade (<i>TaqMan Low Density Array</i>)
TLR	Receptor do tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TM	Marca (<i>Trade Mark</i>)

TNM	Tamanho/extensão do tumor primário (T), número de linfonodos regionais (N), metástase (M)
TP53	Proteína tumoral p53
TP63	Proteína tumoral p63
TP73	Proteína tumoral p73
uNIV	NIV do tipo usual
VIN	Neoplasia intraepitelial vulvar
VSCC	Carcinoma de células escamosas da vulva
ΔCT	Delta CT
ΔNp63	Delta N p63
$\Delta\Delta$CT	Delta Delta CT

LISTA DE SIGLAS

A.C.Camargo	Antônio Cândido Camargo
ATCC	American Type Culture Collection
AJCC	Comitê da Junta Americana de Câncer (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisas em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISSVD	Sociedade Internacional para o estudo de doenças vulvovaginais (<i>The International Society for the Study of Vulvovaginal Disease</i>)
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
NCI	Instituto Nacional de Câncer (<i>National Cancer Institute</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
+	Mais
±	Mais ou menos
g	Gramas
h	Horas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milimol
nG	Nanograma
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
°	Graus
°C	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
µg	Microgramas
µL	Microlitros

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Epidemiologia do Carcinoma de Vulva.....	2
1.2	Aspectos Anatômicos e Histológicos da Vulva.....	3
1.3	Tipos Histológicos.....	4
1.4	Etiologias do Carcinoma de Vulva.....	6
1.5	Fatores de Risco.....	6
1.5.1	O Vírus HPV.....	7
1.5.2	Neoplasias Intraepiteliais Vulvares (NIVS).....	9
1.5.3	Outros Fatores de Risco para o Carcinoma Vulvar.....	10
1.6	Aspectos Clínicos.....	11
1.7	Tratamento.....	14
1.8	Prognóstico.....	17
1.9	RNAS não Codificantes (NCRNAS).....	18
1.10	Micrornas.....	20
1.10.1	Aspectos Moleculares dos Micrornas.....	20
1.10.2	Biogênese dos Micrornas.....	21
1.10.3	Mecanismos de Regulação.....	23
1.10.4	Desregulação de Micrornas.....	24
1.11	Micrornas e Câncer.....	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral.....	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	ARTIGOS	35
3.1	ARTIGO #1: microrna portraits in human vulvar carcinoma.....	35
3.2	ARTIGO #2: MIR-223-5P works as an oncomir in vulvar carcinoma by p63 regulation.....	63

4	CONCLUSÕES	96
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Artigo “Characterization of Sociodemographic and Clinicopathological Features in Brazilian Patients with Vulvar Squamous Cell Carcinoma”
- Anexo 3** Artigo “MicroRNA Portraits in Human Vulvar Carcinoma”
- Anexo 4** Artigo “Clinical significance of the interaction between non-coding RNAs and the epigenetics machinery. Challenges and opportunities in oncology”
- Anexo 5** Artigo “Design of a miRNA sponge for the miR-17 miRNA family as a therapeutic strategy against vulvar carcinoma”
- Anexo 6** Capítulo “MiRNA Expression Assays”

INTRODUÇÃO

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA DE VULVA

Neoplasias que acometem o sistema reprodutivo feminino são consideradas um sério problema de saúde da atualidade, uma vez que representam a segunda maior causa de morte dentre as mulheres, logo atrás do câncer de mama (AKHTAR-DANESH et al. 2014; CHOKOEVA et al. 2015). Dentre essas neoplasias, o carcinoma de vulva é considerado o quarto mais comum, abrangendo cerca de 3 a 5% dos tumores malignos ginecológicos (FRISTACHI 2004; BUXANT et al. 2005; STROUP et al. 2008; DE MELO MAIA et al. 2012; ALKATOUT et al. 2015).

Comparados a outros tipos de câncer, os tumores que acometem a vulva são considerados raros. Atualmente, a incidência mundial deste tipo de tumor é de aproximadamente 2.4/100.000 mulheres, sendo estimados para o ano de 2015, apenas para os Estados Unidos, o diagnóstico de cerca de 5150 novos casos de câncer de vulva no país, levando a 1080 mortes (National Cancer Institute-NCI 2015). Dados epidemiológicos para o Brasil, no entanto, são desatualizados. Alguns autores indicavam, na década de 90, que a incidência deste tipo de tumor estaria em considerável ascensão no país, crescendo 2,4% ao ano entre 1992 a 1998 (JONES et al. 1997; LANNEAU et al. 2009). Um estudo de 1992 demonstrou que a cidade de Recife possuía a maior incidência de carcinoma de vulva no mundo, com uma taxa de 5.6/100.000 mulheres por ano (IARC 1992). Entre os anos 2000 e 2005, a cidade continuou mostrando a mais alta incidência quando comparada a outras cidades

brasileiras – 1.18/100.000 mulheres por ano. No mesmo período, outras cidades brasileiras mostraram elevada incidência: Goiânia (1.28/100.000 mulheres/ano) e Campo Grande (1.3/100.000 mulheres/ano). O dado epidemiológico mais recente na população brasileira data de 2011 e naquele ano, o maior registro de incidências da doença foi observado na cidade de São Paulo: 1.44/100.000 mulheres/ano (Ministério da Saúde 2011). De fato, WAGNER et al. (2015) descrevem que os dados epidemiológicos para doenças vulvo-vaginais são limitados fora da Europa e da América do Norte.

1.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DA VULVA

A vulva compreende a porção externa da genitália feminina, a qual inclui o monte púbico, pequenos e grandes lábios, clitóris, vestíbulo, introito vaginal e meato uretral (FRISTACHI 2004; ALKATOUT et al. 2015), e tem como funções o direcionamento do fluxo urinário, a prevenção da entrada de corpos estranhos no trato urogenital, além de ser um órgão sensorial para a função sexual (ALKATOUT et al. 2015).

A vulva apresenta abundante vascularização e inervação (FONSECA-MOUTINHO 2008). A artéria pudenda interna e, em menor extensão, a artéria pudenda externa são responsáveis pelo suprimento sanguíneo da região. Já os nervos ílio-inguinal e genitofemoral atuam na inervação da porção anterior do órgão, ao passo que a porção posterior é inervada pelo ramo perineal do nervo posterior cutâneo. Além disso, a maior porção da vulva é drenada vasos linfáticos que passam lateralmente aos linfonodos superficiais inguinais (ALKATOUT et al. 2015).

Histologicamente falando, tanto o monte púbico quanto os grandes lábios são cobertos por epitélio escamoso ceratinizado estratificado, contendo folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas. Já os pequenos lábios não apresentam tamanha ceratinização, nem folículos pilosos ou tecido adiposo subjacente. No entanto, eles também contém glândulas sebáceas e sudoríparas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

1.3 TIPOS HISTOLÓGICOS

O carcinoma da vulva pode se originar a partir de quaisquer componentes histológicos mencionados na seção anterior.

Dentre os carcinomas vulvares, o tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas (CEC), também chamado de carcinoma epidermoide, representando de 90 a 95% dos casos (PINTO 2002; BUXANT et al. 2005; ALKATOUT et al. 2015). O melanoma vulvar corresponde ao segundo tipo mais comum de carcinomas da vulva (2 a 4% dos casos), sendo que a maior parte das lesões acomete o clitóris ou os pequenos lábios (TRIMBLE et al. 1992; HOLSCHNEIDER E BEREK 2002; ALKATOUT et al. 2015). Adenocarcinomas, carcinomas de células basais, sarcomas e doença de Paget são menos frequentes, representando cerca de 1% dos casos (HOLSCHNEIDER e BEREK 2002; FIGUEIREDO 2004; RICCI et al. 2008).

Atualmente, os carcinomas de células escamosas são histologicamente divididos em condilomatosos, basaloides e ceratinizantes, sendo os ceratinizantes os mais frequentes, correspondendo a 65 a 80% dos casos de CEC (MEDEIROS et al.

2005). Estes tumores apresentam notável maturação celular e ceratinização não estando, na maior parte dos casos, associados à infecção por HPV, mas sim à presença de Neoplasia Intraepitelial Vulvar (NIV) diferenciada e dermatoses inflamatórias (CRUM e GRANTER 2006). Trata-se de um tipo histológico que acomete, predominantemente, mulheres pós-menopausa, com idade em torno de 65 anos (RICCI et al. 2008; HACKER 2009; ALKATOUT et al. 2015).

Já os carcinomas dos tipos condilomatosos e basaloides ocorrem, em sua maioria, em mulheres pré ou peri-menopausa. Ao passo que os tumores do tipo basaloide possuem crescimento tipicamente em fileiras ou ninhos dentro do estroma desmoplásico com ceratinização focal, os do tipo condilomatoso exibem uma invasão em ninhos irregulares ou com reentrâncias, na maior parte dos casos, com proeminente ceratinização (VAN DE NIEUWENHOF et al. 2009; ALKATOUT et al. 2015).

Os carcinomas escamosos vulvares também podem ser categorizados de acordo com a sua diferenciação histológica, como mostrado no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Classificação dos carcinomas escamosos da vulva de acordo com o grau de diferenciação celular

Grau de diferenciação	Nomenclatura	Características
Bem diferenciado	CEC 1	Apresenta notável maturação celular e ceratinização, estando frequentemente associado à NIV diferenciada e dermatoses inflamatórias. Apresenta atipia leve a moderada nas células da camada basal, sendo que esta diminui à medida que ocorre a maturação celular.
Moderadamente diferenciado	CEC 2	Tumores frequentemente associados à NIV clássica e o vírus do HPV. Apresenta camadas de células neoplásicas imaturas com alta relação núcleo-citoplasma.
Pouco diferenciado	CEC 3	Comumente associados a HPVs de alto risco. Células apresentam perda de polaridade e relação núcleo-citoplasma alterada.
<i>Legenda:</i> CEC (Carcinoma de células escamosas); NIV (Neoplasia Intraepitelial Vulvar); HPV (Papilomavírus Humano).		

1.4 ETIOLOGIAS DO CARCINOMA DE VULVA

Diversos estudos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e moleculares indicam a existência de duas entidades etiogênicas do carcinoma vulvar: em um primeiro grupo, as mulheres acometidas por estes tumores são mais velhas – de 55 a 85 anos de idade – e desenvolvem, tipicamente, um tipo ceratinizante de carcinoma de células escamosas invasivo, estando associado ao líquen escleroso, hiperplasia escamosa, NIV do tipo diferenciada e mutações em *TP53*, não estando estes tumores diretamente relacionados à infecção pelo HPV (MONK et al 1995; PINTO 2002; WOELBER et al 2009).

Já o segundo grupo é composto de mulheres mais jovens, na faixa etária entre 35 e 65 anos de idade, nas quais os tumores, geralmente do tipo basaloide ou condilomatoso, estão frequentemente relacionados à infecção por HPVs de alto risco, tais como o HPV16, 18 e 33 (MONK et al 1995; WOELBER et al 2009). Neste grupo, fatores de predisposição tais como histórico prévio de condilomas e/ou doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), presença de NIV do tipo usual, baixo nível sócio-econômico e tabagismo possuem grande influência (LANDIS et al. 1998; DE MELO MAIA et al. 2013).

1.5 FATORES DE RISCO

Décadas atrás, o carcinoma vulvar era tido como uma doença que acometia apenas mulheres em idade avançada, entre 65 e 75 anos. No entanto, o aumento da incidência tanto entre mulheres acima de 70 anos quanto em mulheres jovens tem

sido considerado nos últimos anos (FRISTACHI 2004; BUXANT et al. 2005; WANG et al. 2008), estando este aumento relacionado, principalmente, à infecção pelo HPV.

1.5.1 O vírus HPV

O papilomavírus humano (HPV) já foi amplamente demonstrado como um importante agente etiológico para um grande espectro de doenças do trato anogenital, como no câncer cervical, anal e vulvar. Trata-se de um vírus que possui como material genético o DNA dupla fita e que, uma vez integrado ao genoma da célula hospedeira, pode causar rearranjos genéticos, deleções, inversões, translocações cromossômicas, ativação de proto-oncogenes e perda de heterozigose, gerando instabilidade genômica e aumentando o risco de transformação neoplásica (AKAGI et al. 2014; FERNANDES et al. 2015).

Sabe-se que o ciclo de vida do HPV está diretamente relacionado ao programa de diferenciação celular (PINTO 2002). No entanto, tem sido demonstrado que a infecção pelo HPV em si não é suficiente para a transformação da célula infectada, se esta não for acompanhada por eventos epigenéticos adicionais, incluindo a inflamação, facilitada pela exposição a fatores ambientais, ou devido a mecanismos imunológicos alterados (MUÑOZ et al. 2006; TROTTIER e FRANCO 2006; FERNANDES et al. 2015).

Ao infectar as células basais do epitélio vulvar por meio de defeitos na mucosa escamosa, a expressão de oncogenes virais precoces do HPV (E5, E6 e E7, sendo E de “*early*”) e sua interação com proteínas regulatórias do ciclo celular, bloqueia a atividade supressora de tumor das mesmas, levando à transformação

neoplásica. Ao passo que a proteína viral E5 parece ter importância nas fases iniciais do curso da infecção, as proteínas E6 e E7 são responsáveis pela interação juntamente à P53 e pRB, respectivamente, levando ao bloqueio da atividade supressora de tumor destas proteínas (ZUR HAUSEN 2002). O ciclo de vida do vírus é, portanto, intimamente associado ao programa de diferenciação da célula intraepitelial do hospedeiro (PINTO 2002; ZUR HAUSEN 2002).

Mais adiante na infecção viral, após a entrada do HPV nas camadas suprabasais, genes virais tardios passam a ser expressos, estando estes envolvidos na síntese de proteínas estruturais (FIGUEIREDO 2004). Nas camadas superiores do epitélio, partículas virais são, então, montadas e liberadas para infecção de outras células (ZUR HAUSEN 2002).

A maior parte dos carcinomas vulvares não parece estar relacionada à infecção pelo HPV. Porém, dentre os tumores de vulva positivos para o vírus, a maior parte dos estudos aponta que o tipo 16 é o mais frequentemente encontrado, seguido pelos tipos 33 e 18 (PINTO 2002; RODRIGUES 2013). Ainda, tumores vulvares HPV positivos foram associados com uma melhor sobrevida global das pacientes (RODRIGUES et al. 2013).

Com o advento da vacina profilática contra diversos tipos de HPV de alto risco, acredita-se que a implementação da mesma poderá trazer grande benefício na diminuição na incidência do câncer vulvar e das lesões intraepiteliais associadas ao HPV, particularmente em mulheres jovens (HACKER 2009; NYGÅRD et al. 2014). No entanto, de acordo com um modelo matemático publicado em 2012, pode-se levar até 40 anos após o início dos programas de vacinação contra o HPV, para que

as reduções nas taxas de incidência de câncer sejam observadas (VAN DE VELDE et al. 2012).

1.5.2 Neoplasias Intraepiteliais Vulvares (NIVs)

A definição de neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) refere-se à uma proliferação de células basais atípicas no epitélio vulvar. A sigla NIV foi introduzida no início dos anos 1980 para definir, com um termo único, as lesões displásicas e o carcinoma *in situ* da vulva. Em 1986, a classificação das NIVs foi adotada pela Sociedade Internacional para o Estudo de Doenças Vulvo-vaginais (ISSVD) e em 2004, a entidade passou por alterações em sua terminologia, baseadas em critérios morfológicos e patogénéticos, sendo atualmente subdivididas em dois grupos: NIV do tipo usual e NIV do tipo diferenciada (PRETI et al. 2015).

As NIVs usuais são as mais comumente encontradas e compreendem as lesões de alto grau (KNOPP et al. 2009; PRETI et al. 2015), sendo possível detectar o genoma de HPVs de alto risco em 66 a 100% dos casos contendo este tipo de NIV, especialmente o HPV16 (FONSECA-MOUTINHO 2008; PRETI et al. 2015).

As NIVs diferenciadas, por sua vez, se apresentam como lesões unifocais e, geralmente, se localizam nas adjacências de carcinomas escamosos invasivos bem diferenciados (FONSECA-MOUTINHO 2008) e, em sua maioria, não estão associadas ao vírus do HPV, sendo usualmente encontradas em mulheres com dermatoses crônicas e líquen escleroso associado (KNOPP et al. 2009; PRETI et al. 2015).

Tem sido observado um significativo aumento na incidência de NIVs nos últimos anos, principalmente em mulheres jovens, estando este aumento relacionado,

principalmente, com a mudança do comportamento sexual e infecção pelo vírus do HPV (HACKER 2009). As NIVs são consideradas lesões precursoras em alguns casos de câncer vulvar (RICCI et al. 2008), sendo que quase 40% das pacientes com NIV do tipo usual (uNIV) possuem histórico de lesão do trato genital inferior em decorrência de infecção pelo HPV. É importante ressaltar que a resposta imune da paciente também é um fator crucial em relação à persistência tanto do vírus quanto das uNIVs (PRETI et al. 2015).

1.5.3 Outros fatores de risco para o carcinoma vulvar

Faz-se necessário mencionar, ainda, outros fatores de risco já bem estabelecidos epidemiologicamente para o carcinoma vulvar, sendo estes relacionados à aspectos comportamentais, reprodutivos, hormonais e genéticos das mulheres. Histórico de verrugas genitais ou de doenças imunossupressoras crônicas tais como o HIV, presença de outros carcinomas genitais, diabetes, obesidade, hipertensão, além de estados de imunossupressão, são apontados como importantes fatores de risco para o carcinoma vulvar (PINTO 2002; DAVIDSON et al. 2003; FIGUEIREDO 2004). Idade avançada, estando esta relacionada à ocorrência de mutações no epitélio vulvar, decorrentes do processo de envelhecimento (PINTO 2002); tabagismo, um dos mais bem estabelecidos cofatores do HPV na etiologia das malignidades da cérvix uterina e da vulva (IARC 1992; HUSSAIN et al. 2008; INSINGA et al. 2008); condições sócio-econômicas; alto número de parceiros sexuais; idade precoce da primeira relação sexual e baixo grau de escolaridade das pacientes (BRINTON et al. 1990; MADSEN et al. 2008; DE MELO MAIA et al.

2013) também fazem parte do espectro de fatores que proporcionam às mulheres um risco aumentado para o carcinoma vulvar.

1.6 ASPECTOS CLÍNICOS

Os sinais e sintomas do carcinoma vulvar são, geralmente, difusos e cerca de 10% das pacientes apresentam-se assintomáticas (FONSECA-MOUTINHO 2008). Entretanto, quando presentes, os sinais mais comuns incluem prurido, seguido por ulceração, presença de massa palpável, dor localizada e sangramento (HACKER 2009; DE MELO MAIA et al. 2013). Um estudo realizado em 2013 por nosso grupo, contendo uma casuística numericamente importante de pacientes da população brasileira, demonstrou que a maior parte das mulheres com câncer de vulva apresentava sintomas por cerca de 6 meses, variando de 15 dias até 120 meses (DE MELO MAIA et al. 2013).

O diagnóstico do câncer vulvar é, geralmente, realizado através da avaliação do histórico clínico, do exame físico detalhado e da vulvoscopia, seguido por biópsia (FIGUEIREDO 2004; HACKER 2009; RICCI et al. 2011). Ao exame físico, as lesões malignas da vulva apresentam-se, geralmente, na forma de superfície ulcerada, nodular ou exofítica, podendo ser avermelhada, leucoplásica ou de aparência verrucosa (BENEDET 2000; HACKER 2009). É recomendado que todos os casos suspeitos de carcinoma vulvar sejam biopsiados para confirmação diagnóstica e caracterização histológica, antes do emprego de qualquer terapia definitiva (BENEDET 2000).

A avaliação do tamanho tumoral, extensão de acometimento da mucosa adjacente e envolvimento linfonodal ao diagnóstico são de suma importância para o planejamento correto do tratamento (FIGUEIREDO 2004; MOORE et al. 2009). Para tanto, adotam-se, atualmente, o sistema de estadiamento clínico proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) e modificado para o câncer de vulva, correlacionado com o sistema de classificação TNM (T: tamanho do tumor, N: linfonodos; M: metástase) da Junta do Comitê Americano de Câncer (AJCC), como mostra o **Quadro 2**.

Quadro 2 – Estadiamentos TNM e FIGO para o carcinoma vulvar

Tumor primário (T)		
TNM	FIGO	
TX		Tumor primário não pode ser avaliado
T0		Sem evidências de tumor primário
Tis*		Carcinoma in situ (pré-invasivo)
T1a	IA	Lesões ≤2 cm, confinadas à vulva ou períneo, com invasão estromal ≤1 mm**
T1b	IB	Lesões >2 cm ou qualquer tamanho com invasão estromal >1 mm, confinada à vulva ou períneo
T2	II	Tumor de qualquer tamanho com extensão às estruturas perineais adjacentes (terço distal da uretra ou vagina, envolvimento anal)
T3	IVA	Tumor de qualquer tamanho com extensão a dois terços proximais da uretra, da vagina, mucosa da bexiga, mucosa retal ou fixado ao osso pélvico
Linfonodos regionais (N)		
TNM	FIGO	
NX		Linfonodos regionais não puderam ser avaliados
N0		Ausência de metástase linfonodal regional
N1		1 or 2 linfonodos regionais (inguinofemorais) com as características abaixo (vide N1a, N1b)
N1a	IIIA	1 or 2 linfonodos acometidos, < 5 mm cada
N1b	IIIA	1 linfonodo regional acometido, ≥5 mm
N2		Linfonodos regionais (inguinofemorais) com as características abaixo (vide N2a, N2b, N2c)
N2a	IIIB	3 ou mais linfonodos acometidos, < 5 mm cada
N2b	IIIB	2 ou mais linfonodos regionais acometidos, ≥5 mm
N2c	IIIC	Linfonodos regionais acometidos com extensão extracapsular
N3	IVA	Linfonodos regionais acometidos fixos ou ulcerados
Metástase à distância (M)		
TNM	FIGO	
M0		Sem metástase à distância
M1	IVB	Metástase(s) à distância (incluindo linfonodos pélvicos)
* Classificação FIGO já não inclui o Estadio 0 (Tis)		
** Profundidade de invasão: medida do tumor desde a junção epitélio-estromal da papila dérmica mais superficial		
adjacente, até o ponto de invasão mais profundo		
Fonte: FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2014) e EDGE et al. 2010		

1.7 TRATAMENTO

O tratamento de escolha para o câncer de vulva é baseado, principalmente, na abordagem cirúrgica (COULTER E GLEASON 2003; KNOPP et al. 2009; DE MELO MAIA et al. 2013), tendo esta sido substituída ao longo dos anos de uma abordagem ultraradical associada com alta morbidade para outra que leva em conta procedimentos cirúrgicos menos extensivos, com menor morbidade e com melhores resultados psicossociais, sem o comprometimento da sobrevida das pacientes (BAIOCCHI e ROCHA 2014).

Vários tipos de procedimentos cirúrgicos tem sido usados na prática médica (GHURANI e PENALVER 2001; SCHEISTRØEN et al. 2002; DE HULLU et al. 2006), desde a ressecção ampla da lesão, passando pela vulvectomy simples (ressecção dos grandes e pequenos lábios, região clitoridiana e da região interna vestibular), vulvectomy radical (ressecção completa da vulva, desde a região púbica, sulcos gênio-femorais e posteriormente o períneo, contornando o ânus, seguida de linfadenectomia), até a vulvectomy supra-radical (vulvectomy radical associada ao esvaziamento linfonodal pélvico bilateral) (COELHO e COSTA 2005).

Metástases linfáticas inguinais são estimadas em 25 a 30% das pacientes com câncer de vulva (DE HULLU e VAN DER ZEE 2006; WOELBER et al. 2011; BAIOCCHI e ROCHA 2014) e as diretrizes atuais recomendam que a linfadenectomia inguinofemoral completa seja realizada, ao invés da linfadenectomia superficial para pacientes sem indicação para biópsia de linfonodo sentinela. Dissecção do linfonodo sentinela, por sua vez, emergiu como a abordagem

preferencial para pacientes com linfonodos clinicamente negativos (BAIOCCHI e ROCHA 2014).

As recomendações atuais pelas diretrizes de prática clínica do Comitê de Oncologia Ginecológica da FIGO são de que devem ser levados em conta a avaliação da extensão da doença, acometimento linfonodal, histórico médico, estado geral da paciente e recorrência do tumor (MOORE et al. 2009). Especificamente em relação aos estadiamentos, é recomendado que os carcinomas *in situ* e tumores FIGO IA devem ser tratados por vulvectomy superficial parcial, FIGO IB e II por meio de vulvectomy parcial seguida de linfadenectomia, e FIGO III e IVA devem ser tratados com vulvectomy radical (*en bloc*) seguida por linfadenectomia (MAGGINO et al. 2000; SCHEISTRØEN et al. 2002).

Além da abordagem cirúrgica, o tratamento do câncer vulvar também pode incluir a radioterapia e quimioterapia, principalmente nos casos chamados “carcinomas vulvares localmente avançados”, uma entidade não totalmente definida até o presente momento, a qual pode ser caracterizada tanto como FIGO III quanto FIGO IV (MICHELETTI e PRETI 2014). Para estes casos, a radioterapia pode ser administrada de modo a prevenir recorrência local em pacientes com margens comprometidas (FAUL et al. 1997). Outra opção seria a radioterapia somente, ocasionalmente combinada com quimioterapia, além da radioterapia pré-operatória por si só, ou combinada à quimioterapia, de modo a tornar o tumor ressecável (MICHELETTI e PRETI 2014).

Em pacientes com envolvimento anorretal, uretral e/ou da bexiga, aquelas em que o tumor apresenta-se fixo ao osso ou com amplo acometimento linfonodal, a quimiorradiação é recomendada. A indicação é que seja empregada a Cisplatina em

monoquimioterapia, 5-Fluorouracil (5-FU), ou Mitomicina C combinada com radioterapia (ALKATOOUT et al. 2015). No entanto, a quimioterapia, exceto quando no contexto da neoadjuvância, foi demonstrada em vários estudos como sendo paliativa e, na maior parte dos casos, ineficaz (MARTINEZ-PALONES et al. 2006; ALKATOOUT et al. 2015).

Cabe ressaltar que, apesar das abordagens cirúrgicas atuais apresentarem uma redução das complicações pós-operatórias, a morbidade após a cirurgia para remoção do tumor vulvar ainda é alta. Um levantamento realizado pelo nosso grupo em 2013 demonstrou que quase 60% das pacientes apresentaram complicações, sendo a deiscência da ferida a complicação mais comum, seguida por infecção e necrose dos retalhos (DE MELO MAIA et al. 2013). Problemas psico-sexuais, tais como o medo, distorção da imagem corporal, baixa auto-estima e depressão encontram-se amplamente descritos na literatura, especialmente entre pacientes mais jovens, após a abordagem cirúrgica (DE HULLU e VAN DER ZEE 2006; WILLS e OBERMAIR 2013).

Apesar dos avanços cirúrgicos no tratamento do câncer de vulva, estudos se fazem necessários para esclarecer questões sobre a indicação de diferentes abordagens que continuam sem resposta (WOELBER et al. 2011; BAIOCCHI e ROCHA 2014). Entretanto, existe um consenso de que o manejo ideal da doença deve ser baseado em uma abordagem mais individualizada da paciente (MOORE et al. 2009) e, para tanto, faz-se necessários estudos aprofundados acerca da biologia tumoral e mecanismos da tumorigênese da vulva, de modo a encontrar marcadores prognósticos e preditivos de resposta mais específicos.

1.8 PROGNÓSTICO

Em geral, o prognóstico das pacientes com carcinoma da vulva é bastante favorável quando o tratamento apropriado é fornecido em tempo hábil. Vários estudos mostram que a a maior parte das pacientes são diagnosticadas em estádios clínicos iniciais (STROUP et al. 2008; DE MELO MAIA et al. 2013) e estas pacientes apresentam melhor sobrevida global (DE MELO MAIA et al. 2013). O prognóstico destas pacientes, portanto, é altamente influenciado pelo estadiamento em que o tumor se encontra.

Cabe ressaltar que o estadiamento clínico está diretamente ligado ao acometimento linfonodal, sendo este um dos mais importantes divisores de água para estadiar os tumores, como demonstrado anteriormente. Desde 1988, quando a Comissão de Ginecologia Oncológica da FIGO reconheceu a importância da avaliação do acometimento linfonodal nas pacientes com carcinoma de vulva, até os dias atuais, o status linfonodal passou a ser tido como o fator prognóstico isolado mais importante para este tipo de tumor (HACKER et al. 1983; HOFFMAN et al 1985; FIGO 1989; MICHELETTI e PRETI 2014). As taxas de sobrevida global em 5 anos parecem variar entre 70 a 93% para pacientes sem acometimento linfonodal, e entre 25 a 41% para pacientes com acometimento de dois ou mais linfonodos (GADDUCCI et al. 2006). Outros fatores prognósticos importantes para o carcinoma da vulva são estádios clínicos mais avançados, tamanho da lesão e profundidade de invasão (CREASMAN et al. 1997; MAGGINO et al. 2000; ALKATOUT et al. 2015).

Apesar do fato do carcinoma da vulva ser um tumor relativamente raro, comparado aos demais tipos tumorais, muito se sabe acerca dos aspectos clínicos e patológicos deste tumor. No entanto, ainda se faz necessária uma abordagem mais individualizada da paciente de modo a reduzir a morbidade da doença, de modo a preservar ou restaurar a função do órgão e reduzir complicações. Para tanto, torna-se cada vez mais urgente a busca de mecanismos biológicos que atuem de forma a identificar seletivamente os tumores da vulva de melhor ou pior prognóstico de modo a potencializar os benefícios do tratamento clínico, em parceria com a pesquisa translacional. Em busca destes mecanismos, o presente trabalho propôs o estudo de moléculas sabidamente desreguladas em virtualmente todos os tumores estudados até então, muito em voga nos últimos anos, mas que não haviam ainda sido descritos no câncer vulvar, os chamados microRNAs. Portanto, estas moléculas serão abordadas com maior ênfase nas seções que se seguem.

1.9 RNAs NÃO CODIFICANTES (ncRNAs)

Em 1952, o conceito do “Dogma Central da Biologia” foi proposto por Francis Crick (CRICK 1958), no qual a expressão da informação contida nos genes das células seria dada de forma unidirecional, através do qual o DNA seria transcrito em RNA mensageiro e este, por sua vez, seria traduzido em proteína. Anos após a difusão deste conceito, a ciência molecular se deparou com uma quebra de paradigma que promoveu uma nova visão do então chamado dogma: a descoberta de uma classe extensa de RNAs evolucionariamente conservados e que não codificam proteínas, os chamados “RNAs não codificantes”, cuja sigla é ncRNAs, mas que

apresentam notável capacidade regulatória celular (COSTA 2010; DE MELO MAIA et al. 2014).

A descoberta dos ncRNAs trouxe, também, outra quebra de paradigma no que diz respeito à teoria do chamado “DNA lixo”, do inglês “*Junk DNA*”, proposta em meados dos anos 60, e que abrangia todos os RNAs que não eram traduzidos – sabe-se hoje que cerca de 70% do genoma é transcrito, mas somente 2% é traduzido – e que acreditava se tratar de RNAs não funcionais (CHENG et al. 2005; CARNINCI et al. 2008; WAHLESTEDT 2013; DE MELO MAIA et al. 2014).

Sabe-se, atualmente, que os ncRNAs possuem papéis diversos e importantes, principalmente na regulação da tradução e da transcrição tanto de genes codificantes quanto não codificantes (COSTA 2010; RÖTHER e MEISTER 2011), o que resulta na constatação de que o transcriptoma do câncer é mais complexo do que anteriormente imaginado (DE MELO MAIA et al. 2014).

Os RNAs não codificantes são classificados de acordo com o tamanho da molécula, sendo pequenos (< 200 – 300pb) – incluindo microRNAs, pequenos RNAs de interferência (siRNAs), pequenos RNAs de interferência endógenos (endo-siRNAs) e RNA que interagem com PIWI (piRNAs) – ou grandes, os chamados RNAs longos não codificantes, lncRNAs (>200-300pb) (RÖTHER e MEISTER 2011; DE MELO MAIA et al. 2014).

1.10 MICRORNAS

1.10.1 Aspectos moleculares dos microRNAs

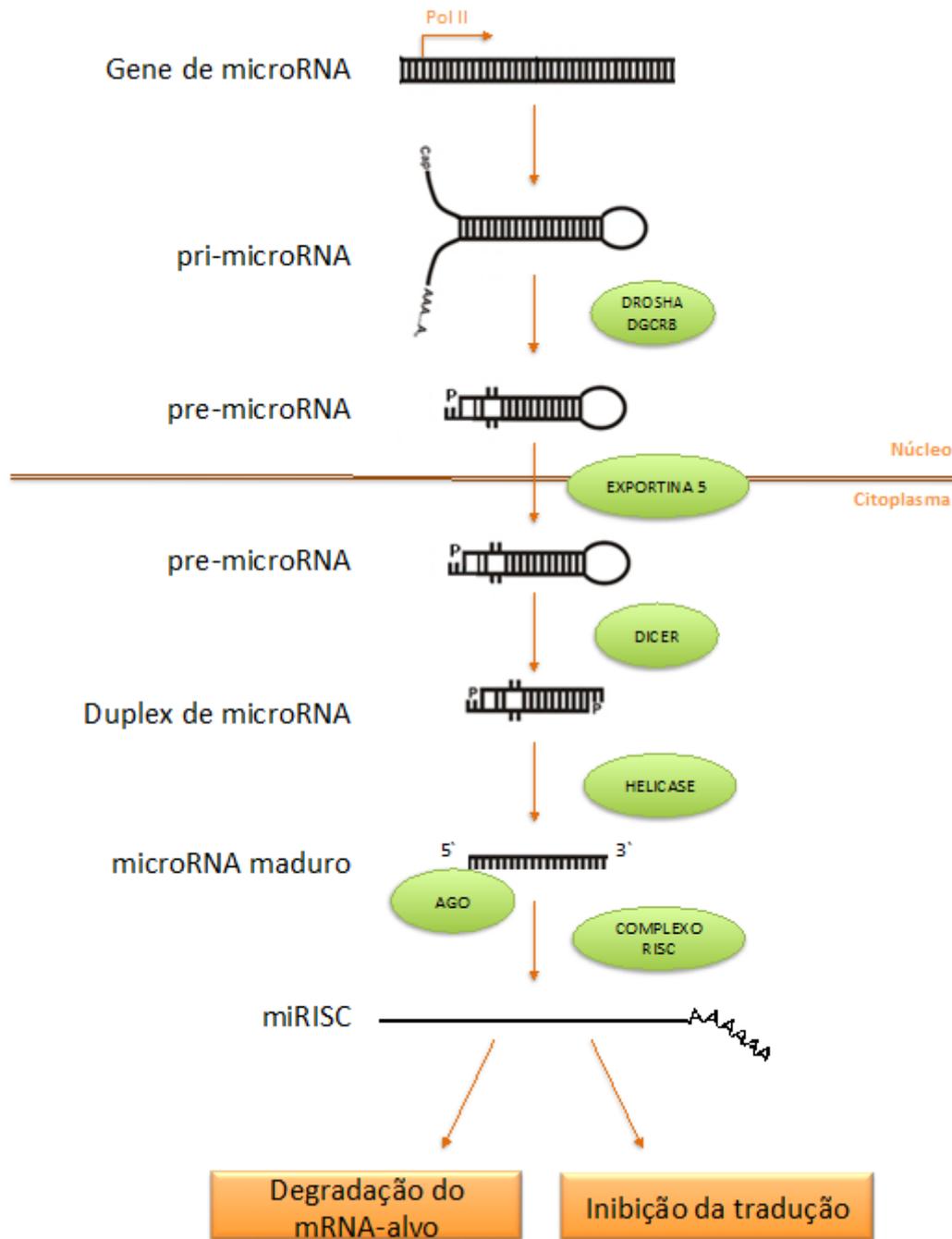
Desde a sua descoberta, LEE et al. (1993) e WIGHTMAN et al. (1993), muito tem sido descrito na literatura a respeito dos microRNAs, pequenos RNAs endógenos, de aproximadamente 22 nucleotídeos, fita simples e que, como mencionado anteriormente, constituem uma classe extensa de RNAs não codificantes responsáveis por diversos mecanismos regulatórios celulares e com mecanismos de ação de grande complexidade (CREIGHTON et al. 2008; MAIA et al. 2014).

MicroRNAs exibem um perfil de expressão tecido-específico e estão presentes em diversas vias regulatórias intrincadas, tendo sido demonstrados como essenciais para o desenvolvimento normal dos mamíferos, manutenção de células-tronco, metabolismo, crescimento celular, interação vírus-hospedeiro, além de serem moduladores de processos celulares fundamentais tais como a apoptose, diferenciação tumoral, invasão tumoral e metástase (BETEL et al. 2008; CREIGHTON et al. 2008; BRAICU et al. 2014). Sua importância é ainda ressaltada pela expressão ubíqua do mesmo em quase todos os tipos de células e a sua conservação evolucionária na maior parte das espécies de plantas e metazoários (BETEL et al. 2008).

1.10.2 Biogênese dos microRNAs

Um gene codificador de microRNA é transcrito pela polimerase II (LEE et al. 2004) como um transcrito primário longo denominado pri-microRNA, que contém uma estrutura em grampo (*hairpin*) de aproximadamente 80 nucleotídeos. Este

transcrito primário pode conter centenas a milhares de pares de bases de comprimento, bem como conter mais de um microRNA. Em seguida, estes primicroRNAs são processados por duas enzimas do tipo RNaseIII chamadas DROSHA e DGCR8, dando origem a um pre-microRNA. A molécula recém-formada é transferida para o citoplasma através da EXPORTINA 5 (Exp5) (YI et al. 2003; BOHNSACK et al. 2004; LUND et al. 2004) onde é clivada pela DICER, outra enzima RNase III, de modo que um duplex de microRNA é obtido, variando de 18 a 24 nucleótidos de comprimento (BERNSTEIN et al. 2001; GRISHOK et al. 2001; HUTVAGNER et al. 2001). O duplex é desenrolado por enzimas do tipo Helicase e uma das fitas maduras é estabilizada por meio da proteína ARGONAUTA (AGO) sendo subsequentemente incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNAi (RISC), mediando a degradação ou a inibição da tradução do mRNA alvo (MISKA 2005; MEOLA et al. 2009; MAIA et al. 2015). Uma representação esquemática da biogênese dos microRNAs está disponível na **Figura 1**.



Fonte: Adaptado de DE MELO MAIA et al. 2015

Figura 1 - Biogênese dos microRNAs. Na parte superior da figura, no núcleo, a Polimerase II transcreve o gene de microRNA em um longo transcrito primário (pri-microRNA) que é clivado por duas enzimas RNase III (DROSHA e DGCR8), dando origem a um pre-microRNA. Este pre-microRNA é transportado para o citoplasma a partir da EXPORTINA 5, onde é clivado pela DICER, dando origem a um duplex de microRNA. O duplex é desenrolado por o Helicases e uma das fitas maduras é estabilizada por meio da proteína ARGONAUTA (AGO), sendo subsequentemente incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNAi (RISC), mediando a degradação ou a inibição da tradução do mRNA alvo (caixas em laranja).

1.10.3 Mecanismos de regulação

Estima-se que mais de 60% do genoma dos mamíferos seja regulado por microRNAs (HAFNER et al. 2012), seja através do direcionamento da repressão traducional ou pela clivagem de mRNAs alvo complementares (CREIGHTON et al. 2008). Um único microRNA é capaz de regular, simultaneamente, centenas de sequências de mRNA, o que destaca o vasto potencial regulatório destas moléculas. Ao mesmo tempo, um único mRNA pode ser regulado por diversos microRNAs (CALIN et al. 2004). De acordo com Thomas Wurdinger do Hospital Geral de Massachusetts e da Escola de Medicina de Harvard (Boston, EUA) “podemos modificar um fenótipo completo se modularmos um único microRNA” (MACK 2007).

Basicamente, o modo pelos quais os microRNAs regulam negativamente seus alvos varia de acordo com o grau de complementariedade entre a sequência semente do microRNA – região compreendida entre as posições 2 e 8 da região 5' do microRNA, também chamada *seed sequence* – e a região 3'UTR do mRNA alvo (EBERT et al. 2007; GARZON et al. 2010). Esta regulação é obtida através da ligação de um microRNA a um mRNA alvo em conjunto com o complexo RISC, provocando a degradação do transcrito de mRNA – ribonucleases associadas ao complexo RISC clivam os mRNAs – ou a inibição da tradução proteica – mecanismo mais comum de regulação gênica em mamíferos, a partir do qual ocorre redução dos níveis proteicos dos alvos, mas não da quantidade de mRNA na célula (BETEL et al. 2008; CREIGHTON et al. 2008).

A literatura relata, ainda, que microRNAs possuem outros alvos, que não os mRNAs complementares, dentre eles: regiões promotoras (KUNEJ et al. 2012),

proteínas (EIRING et al. 2010), DNA (GARZON et al. 2010), receptores do tipo Toll – *Toll-like receptors*, TLR (FABBRI et al. 2012), interação microRNA-microRNA (LAI et al. 2004), interação microRNA-pseudogenes (POLISENO et al. 2010), além da regulação direta da maquinaria epigenética, tais como as DNA metiltransferases DNMT3A e DNMT3B (FABBRI et al. 2007).

Tecnologias cada vez mais sofisticadas e a disponibilidade de novas plataformas de análise tem permitido um maior entendimento em detalhes sobre diversidade de mecanismos existentes no vasto contexto de regulação por microRNAs, adicionando outras camadas à complexidade destas moléculas.

1.10.4 Desregulação de microRNAs

Tendo em vista a diversidade dos processos celulares que envolvem os microRNAs, como previamente descrito, a expressão celular destas moléculas requer mecanismos de regulação precisos. Alterações nos níveis de microRNAs são demonstradas por causar expressão aberrante de genes e subsequentes eventos patológicos.

Desregulação de microRNAs pode ser vista em diversos níveis, a seguir: (1) desregulação transcricional – a expressão de diversos microRNAs é regulada por fatores de transcrição, tais como c-MYC (O'DONNELL et al. 2005; CHANG et al. 2008) e p53 (HERMEKING 2012); (2) alterações epigenéticas, tais como hipermetilação da região promotora de genes de microRNAs (DENG et al. 2008; MAIA et al. 2014); (3) mutações em ponto afetando as sequências de pri-microRNA, pre-microRNA e microRNAs maduros ou grandes mutações no DNA, como deleções e duplicações no *locus* do microRNA; mutações na região 3'UTR do mRNA,

gerando um novo sítio de reconhecimento de microRNAs ou remoção do reconhecimento; mutações nos genes que participam nos mecanismos de biogênese dos microRNAs (DENG et al. 2008; MEOLA et al. 2009); (4) alterações no número de cópias do DNA – genes codificadores de microRNAs frequentemente residem dentro ou próximos a regiões de sítios frágeis, bem como em regiões de perda de heterozigose, de ampliações ou em regiões de quebra (*breakpoints*) (CALIN et al. 2004); (5) disfunções ou desregulações das proteínas-chave na biogênese dos microRNAs, tais como DICER e DROSHA (THOMSON et al. 2006; KUMAR et al. 2007; TORREZAN et al. 2014).

Em suma (**Figura 2**), desregulações transcricionais, alterações epigenéticas, mutações, alterações no número de cópias do DNA e defeitos na biogênese dos microRNAs podem contribuir para a alteração da expressão e/ou do funcionamento destas pequenas moléculas, gerando eventos patológicos, tais como o câncer, como será enfatizado a seguir.

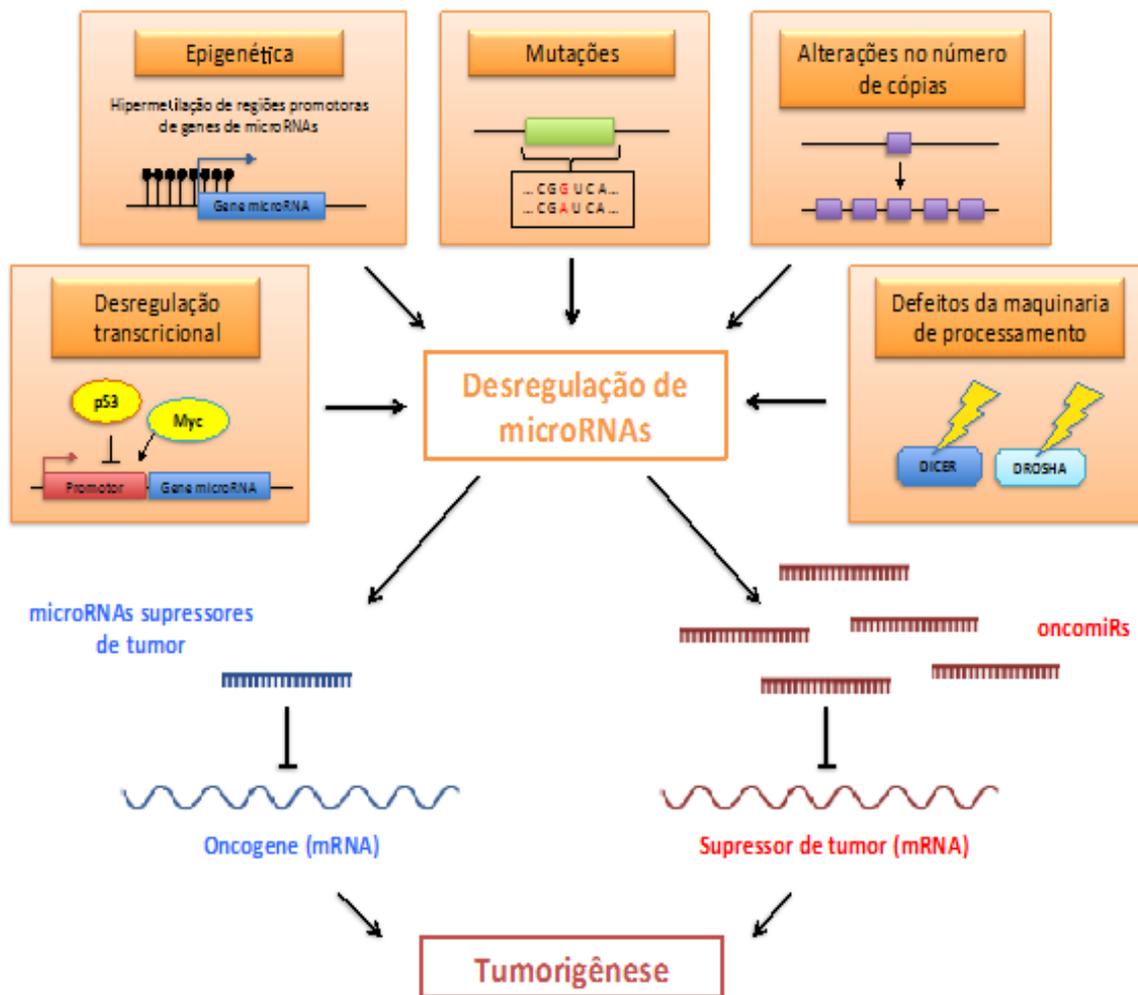


Figura 2 – Desregulação de microRNAs. Nos quadrados em laranja estão destacados os mecanismos de desregulação de microRNAs (Da esquerda para a direita: Epigenética, com hipermetilação da região promotora (caixa azul) indicada como pontos pretos; Mutação, ilustrada como troca de uma base Guanina por Adenina, em vermelho; Alterações no número de cópias de DNA; Desregulação transcricional por p53 e Myc, por exemplo, mostrados em amarelo; e defeitos na maquinaria de processamento de microRNAs, tais como nas enzimas DICER e DROSHA. Todos estes mecanismos levam à alteração de expressão de microRNAs supressores de tumor (azul) e/ou de oncomiRs (vermelho), desencadeando o processo da tumorigênese. MicroRNAs supressores de tumor, tendo sua expressão diminuída, passam a não mais regular efetivamente mRNAs de oncogenes; ao passo que o aumento de expressão de oncomiRs gera um excesso de regulação negativa de genes supressores de tumor, culminando com a tumorigênese.

1.11 MICRORNAS E CÂNCER

Alterações na expressão de microRNAs são observadas em, virtualmente, todos os tumores avaliados até o presente momento (CREIGHTON et al. 2008). Sabe-se que mais de 50% dos microRNAs estão localizados em sítios frágeis do genoma ou em regiões associadas ao câncer (CALIN et al. 2004).

Durante o processo de transformação celular, microRNAs podem ser especificamente desregulados e ter sua expressão e função alteradas, levando a um fenótipo patológico. CALIN et al. (2002) foram os pioneiros na identificação do envolvimento de microRNAs no câncer, mais especificamente na leucemia linfocítica crônica (LLC). Neste estudo inédito, miR-15a e miR-16-1 foram demonstrados como estando deletados ou como tendo sua expressão diminuída na maior parte das amostras de leucemia avaliadas, indicando, naquela época, o potencial do controle regulatório dos microRNAs sobre genes-alvo no câncer. Mais tarde, o mesmo grupo descreveu uma assinatura de microRNAs associada com fatores prognósticos e progressão da doença em LLC (CALIN et al. 2005). Hoje, uma vasta gama de microRNAs é reconhecida por controlar a expressão de genes supressores de tumor e oncogenes, e o padrão global de expressão destes microRNAs tem sido utilizado para fins diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta à tratamentos.

Em tumores, os microRNAs podem funcionar como oncogenes (CHAN et al. 2005; HE et al. 2005; O'DONNELL et al. 2005; VOORHOEVE et al. 2006) ou supressores de tumor (KEATING et al. 2002; HE et al. 2007). Em situações fisiológicas, um microRNA que regula negativamente um oncogene pode ser definido como um supressor de tumor. Nas células tumorais, este microRNA

apresenta-se com baixa ou nenhuma expressão, gerando o aumento dos produtos proteicos de oncogenes. Por outro lado, microRNAs que regulam negativamente a expressão de genes supressores tumorais podem ser considerados oncogenes, ou oncomiRs e, geralmente, apresentam ganho de função em tumores (ESQUELAKERCHER e SLACK 2006). miR-21, por exemplo, é o microRNA mais hiperexpresso em tumores, quando comparado com tecidos não tumorais, tendo sido o primeiro microRNA a ser descrito como oncomiR (BRAICU et al. 2014). Entretanto, pelo fato dos microRNAs terem diversos alvos, a função destes microRNAs – oncogene ou supressor de tumor – depende do alvo selecionado, e microRNAs podem ter um papel em um determinado tecido e um papel divergente em outro tecido (GARZON et al. 2010).

Diferentes perfis de expressão de microRNAs foram demonstrados como tendo relevância tanto nos processos fisiológicos quanto patológicos (REDIS et al. 2012; SHAH e CALIN 2012). “Deste modo, na era da medicina personalizada, enquanto pesquisadores demonstram os microRNAs como tendo múltiplas funções celulares e conectam a complexidade dos perfis de expressão destes microRNAs com diversas doenças humanas, incluindo o câncer (...), o profissionais da prática clínica visam o uso destas moléculas como ferramentas para abordagens diagnósticas e opções de terapia individualizada” (BRAICU et al. 2014).

Em suma, compreender os papéis destas moléculas tão pequenas, mas de funções tão amplas, é um processo ainda em execução e que parece estar ainda longe de terminar. Entretanto, dados provenientes de estudos pré-clínicos são encorajadores e o potencial uso destas moléculas no futuro ainda é a grande promessa da aplicação translacional em benefício da ciência.

OBJETIVOS

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de expressão de microRNAs em amostras de carcinomas de vulva, de modo a identificar a expressão diferencial dos mesmos nas amostras tumorais e não-tumorais, avaliar a associação da infecção do vírus HPV com alterações de expressão destas moléculas, bem como verificar os possíveis papéis funcionais destes microRNAs e de seus alvos gênicos *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar os perfis de expressão de microRNAs em quarenta amostras parafinadas de carcinomas de vulva, comparando-os com controles não tumorais do mesmo tecido através da técnica de PCR quantitativa em tempo real na plataforma TLDA.
- 2 Comparar os perfis de expressão de microRNAs entre tumores HPV positivos e HPV negativos.
- 3 Correlacionar a expressão dos microRNAs diferencialmente expressos no grupo HPV negativo com dados clinicopatológicos das pacientes.
- 4 Validar a expressão dos microRNAs obtidos na análise de associação com dados clinicopatológicos em amostras de tecido a fresco pela técnica de PCR quantitativa em tempo real com sondas específicas.

- 5 Buscar, *in silico*, por potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos na comparação tumor versus borda normal adjacente e criar uma rede de interações entre estes microRNAs e RNAs mensageiros alvo com relevância na carcinogênese vulvar.
- 6 Investigar um possível papel dos microRNAs relacionados a dados clinicopatológicos através de ensaios celulares de proliferação, migração e invasão por meio da transfecção de oligonucleotídeos em uma linhagem celular de vulva (SW962).
- 7 Identificar os genes alvo dos microRNAs selecionados para análise funcional por meio de algoritmos de predição.
- 8 Avaliar as expressões gênica e proteica dos alvos selecionados, antes e após a transfecção, por meio das técnicas de PCR quantitativo em tempo real, Western Blot e imunofluorescência.
- 9 Verificar a existência de associação entre a expressão proteica dos alvos dos microRNAs selecionados para análise *in vitro* e dados clinicopatológicos de um subgrupo de pacientes por meio da técnica de imunohistoquímica.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

“Não se pode fazer uma omelete sem quebrar os ovos”.

Provérbio Francês

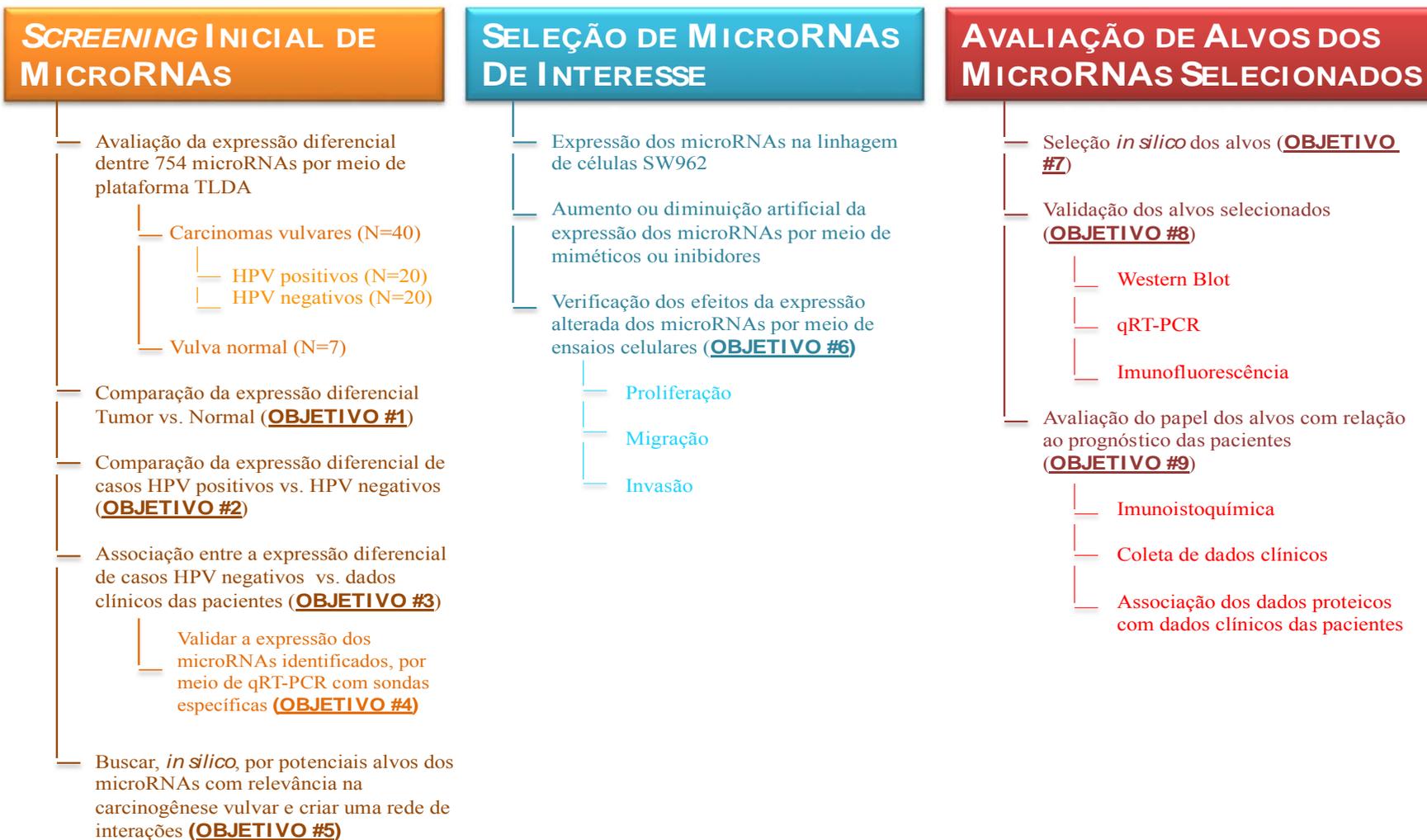


Figura 3 – Delineamento experimental do projeto

ARTIGOS

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo”.

Winston Churchill

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO #1: MICRORNA PORTRAITS IN HUMAN VULVAR CARCINOMA

de Melo Maia B, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues LS, Coutinho-Camillo CM, Baiocchi G, Stiepcich MM, Puga R, de A Lima L, Soares FA, Rocha RM. MicroRNA portraits in human vulvar carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013 Nov;6(11):1231-41. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0121. Epub 2013 Sep 18.

Research Article

Cancer
Prevention
Research

microRNA Portraits in Human Vulvar Carcinoma

Beatriz de Melo Maia¹, André Mourão Lavorato-Rocha¹, Lara Sant'Ana Rodrigues¹, Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo¹, Glauco Baiocchi², Monica Maria Stiepcich³, Renato Puga⁴, Leandro de A. Lima⁵, Fernando Augusto Soares¹, and Rafael Malagoli Rocha¹

Abstract

Unregulated expression of microRNAs is well known and has already been demonstrated in many tumor types. However, in vulvar carcinoma this field has been unknown territory. Our study characterizes microRNA in vulvar tumors through an expression profile of 754 miRNAs, relating this with clinical and anatomopathologic data, and presence of HPV infection. Twenty HPV-negative and 20 HPV-positive samples, genotyped for high-risk HPVs (HPV16, 18, 31, 33) and a pool of seven normal vulvar skin samples were used for the identification of differentially expressed miRNAs by TLDA Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). Twenty-five differentially expressed microRNAs between HPV-positive and HPV-negative groups and 79 differentially expressed on the tumor compared with normal samples were obtained. A network between microRNA expression profiles and putative target mRNAs predicted by target prediction algorithms and previously demonstrated as relevant in vulvar carcinomas, such as *TP53*, *RB*, *PTEN*, and *EGFR* was constructed. Downregulation of both miR-223-5p and miR-19-b1-5p were correlated with the presence of lymph node metastasis; downregulation of miR-100-3p and miR-19-b1-5p were correlated with presence of vascular invasion; overexpression of miR-519b and miR-133a were associated with advanced FIGO staging. In conclusion, our study demonstrates that microRNAs may be clinically important in vulvar carcinomas and our findings may help for further studies on functional implications of miRNA deregulation in this type of cancer. *Cancer Prev Res*; 6(11); 1231–41. ©2013 AACR.

3.2 ARTIGO #2: MIR-223-5P WORKS AS AN ONCOMIR IN VULVAR CARCINOMA BY TP63 REGULATION

de Melo Maia B, Rodrigues LS, Akagi EM, Amaral NS, Ling H, Monroig P, Soares FA, Calin GC, Rocha RM. **MiR-223-5p works as an oncomiR in vulvar carcinoma by TP63 regulation.**

– Submetido ao jornal **Oncotarget** (11 de janeiro de 2016).

Original Article

MiR-223-5p works as an oncomiR in vulvar carcinoma by *TP63* regulation

(Running title: MiR-223-5p works as an oncomiR in vulvar carcinoma)

Beatriz de Melo Maia^{a,b*4}, Iara Santana Rodrigues^a, Erica Mie Akagi^a, Nayra Soares do Amaral^a, Hui Ling^b, Paloma Monroig^b, Fernando Augusto Soares^a, George Adrian Calin^{b,c}, Rafael Malagoli Rocha^a

a Molecular Morphology Laboratory, Anatomic Pathology Department, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

b Department of Experimental Therapeutics, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.

c The Center for RNA Interference and Non-Coding RNAs, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

^{*1} **Corresponding author:** Molecular Morphology Laboratory, Anatomic Pathology Department, AC Camargo Cancer Center, Rua Antônio Prudente, 109. 1o Andar, Patologia Investigativa, Liberdade, São Paulo, SP. ZIP 01509-900.

Phone number: +55 (11) 2189-5000, ext.2960

E-mail address: beatriz.melomaia@gmail.com

CONCLUSÕES

“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça”.

Cora Coralina

4 CONCLUSÕES

Há uma expressão diferencial de 79 microRNAs na comparação entre tecido tumoral e não-tumoral, sendo todos os microRNAs menos expressos nos tumores.

Dentre os microRNAs analisados, 25 deles estão diferencialmente expressos na comparação entre tumores dos grupos HPV positivos e HPV negativos.

A alteração da expressão de microRNAs em câncer de vulva está relacionada a características clínicas das pacientes. A diminuição da expressão dos microRNAs miR-223-5p e miR-19-b1-5p foram correlacionadas com a presença de metástase linfonodal nas pacientes, enquanto a diminuição da expressão dos microRNAs miR-100-3p e, novamente, miR-19-b1-5p foram correlacionadas com invasão vascular; já o aumento de expressão dos microRNAs miR-519b e miR-133a foi associado com estadiamentos FIGO mais avançados (FIGO IIIA, IIIB, IIIC).

A expressão dos microRNAs obtidos na análise de associação com dados clinicopatológicos em amostras de tecido a fresco pela técnica de PCR quantitativa em tempo real com sondas específicas concordou com os resultados de expressão obtidos pela técnica de TLDA para três dos cinco microRNAs (miR-19b-1-5p, miR-133a e miR-223-5p).

Há uma importante interação entre microRNAs diferencialmente expressos na comparação tumor versus borda normal adjacente (n=79) e RNAs mensageiros alvo com relevância na carcinogênese vulvar, tais como *TP53*, *RB*, *PTEN* e *EGFR*.

A adição de miR-223-5p miméticos às células SW962 por meio de transfecção transiente culmina com diminuição das taxas de proliferação e migração

celulares e, em contrapartida, um aumento do potencial invasivo destas células. Neste sentido, sugerimos que este microRNA esteja relacionado com maior agressividade loco-regional do que capacidade metastática dos tumores de vulva. É possível que esta relação possa ser, pelo menos em parte, devido a desregulação da via molecular do TP63.

Após análise *in silico* de potenciais alvos do miR-223-5p, TP63 foi selecionado por meio dos algoritmos de predição miRWalk, Diana mT e miRanda. Nossa busca sugeriu que a região 3'UTR do mRNA de TP63 contém um sítio de ligação complementar à sequência semente do miR-223-5p.

O microRNA miR-223-5p foi demonstrado por afetar a expressão de p63, tanto a nível de proteína (por Western Blot) quanto mRNA (por qRT-PCR).

Foi verificada a existência de associação entre a expressão proteica dos alvos dos microRNAs selecionados para análise *in vitro* e dados clinicopatológicos de um subgrupo de pacientes por meio da técnica de imunohistoquímica. A diminuição da expressão de p63 em amostras de pacientes foi associada com maior invasão tumoral e menor sobrevida global das pacientes.

Nosso estudo demonstrou que microRNAs podem ser clinicamente importantes em carcinomas vulvares e que sua desregulação parece ser importante na carcinogênese vulvar. Além disso, nossos resultados mostram um microRNA em particular, miR-223-5p, como tendo papel importante na regulação de expressão gênica relacionada a valor prognóstico em carcinoma de vulva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"Experiência é o nome chique que eu dou aos meus erros".

Rita Lee

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. **Genome Res** 2014; 24:185–199.

Akhtar-Danesh N, Elit L, Lytwyn A. Trends in incidence and survival of women with invasive vulvar cancer in the United States and Canada: a population-based study. **Gynecol Oncol** 2014;134:314–8.

Alkatout I, Schubert M, Garbrecht N, Weigel MT, Jonat W, Mundhenke C, Günther V. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. **Int J Womens Health** 2015; 7:305-13.

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

Benedet JL, Bender H, Jones H, Ngan HYS, Pecorelli S. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers FIGO Committe on Gynecologic Oncology. **Int J Gynecol Obstetric** 2000; 70:207-312.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature** 2001; 409:363-6.

Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic Acids Res** 2008; 36:D149-53.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA** 2004; 10:185-91.

Braicu C, Maia BM, Berindan-Neagoe I, Calin GA. MiRNA expression assays. In: Netto GJ, Schrijver I. editors. **Genomic applications in pathology**. New York: Springer Science; 2014. p.45-70.

Brinton LA, Nasca PC, Mallin K, Baptiste MS, Wilbanks GD, Richart RM. Case-control study of cancer of the vulva. **Obstet Gynecol** 1990; 75:859-66.

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 Chirurgica Belgica** 2005; 105:418-419.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:15524-9.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med** 2005; 353:1793-801.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004a; 101:11755-60.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004b; 101:2999-3004.

Carninci P, Yasuda J, Hayashizaki Y. Multifaceted mammalian transcriptome. **Curr Opin Cell Biol**. 2008; 20:274-80.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res** 2005; 65:6029-33.

Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. **Nat Genet** 2008; 40:43-50.

Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. **Science** 2005; 308:1149-54.

Chokoeva AA, Tchernev G, Castelli E, et al. Vulvar cancer: a review for dermatologists. **Wien Med Wochenschr** 2015; 165:164-77.

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

Costa FF. Non-coding RNAs: Meet thy masters. **Bioessays** 2010; 32:599-608.

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

Creasman WT, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base report on early stage invasive vulvar carcinoma. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. **Cancer** 1997; 80:505-13.

Creighton CJ, Nagaraja AK, Hanash SM, Matzuk MM, Gunaratne PH. A bioinformatics tool for linking gene expression profiling results with public databases of microRNA target predictions. **RNA** 2008; 14:2290-6.

Crick FH. On protein synthesis. **Symp Soc Exp Biol** 1958;12:138-63.

Crum CP, Granter SR. Squamous **neoplasia of the vulva**. In: Crum CP, Lee KR, editors. **Diagnostic gynecologic and obstetric pathology**. Philadelphia: WB Saunders; 2006. p.109-48.

Davidson EJ, Morris LS, Scott IS, et al. Minichromosome maintenance (Mcm) proteins, cyclin B1 and D1, phosphohistone H3 and in situ DNA replication for functional analysis of vulval intraepithelial neoplasia. **Br J Cancer** 2003; 88:257-62.

de Hullu JA, van der Avoort IA, Oonk MH, van der Zee AG. Management of vulvar cancers. **Eur J Surg Oncol** 2006; 32:825–831.

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

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

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

de Melo Maia B, Ling H, Monroig P, et al. Design of a miRNA sponge for the miR-17 miRNA family as a therapeutic strategy against vulvar carcinoma. **Mol Cell Probes** 2015; 29:420-6.

Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. **Cell Cycle** 2008; 7:2643-6.

Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. **Nat Methods** 2007; 4:721-6.

Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer Verlag; 2010. Gynecologic sites. p.379-386.

Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. **Cell** 2010; 140:652-65.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:259-69.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:15805-10.

Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci USA** 2012; 109:E2110-6.

Faul CM, Mirmow D, Huang Q, Gerszten K, Day R, Jones MW. Adjuvant radiation for vulvar carcinoma: improved local control. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 38:381-9.

Fernandes JV, de Medeiros Fernandes TA, de Azevedo JC, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis. **Oncol Lett** 2015; 9:1015-26.

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

Figueiredo EMA. **Ginecologia oncológica**. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. Câncer da vulva; p.117-22.

Fonseca-Moutinho, J. Neoplasia intraepitelial vulvar: um problema atual. **Rev Bras Oncol Obstetr** 2008; 30:420-6.

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

Gadducci A, Cionini L, Romanini A, Fanucchi A, Genazzani AR. Old and new perspectives in the management of high-risk, locally advanced or recurrent, and metastatic vulvar cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2006; 60:227-41.

Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nat Rev Drug Discov** 2010;9(10):775-89.

Ghurani GB, Penalver MA. An update on vulvar cancer. **Am J Obstet Gynecol** 2001; 185:294-9.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. **Cell** 2001; 106:23-34.

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; 61:408e12.

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

Hafner M1, Lianoglou S, Tuschl T, Betel D. Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. **Methods** 2012; 58:94-105.

He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature** 2007; 447:1130-4.

Hoffman JS, Kumar NB, Morley GW. Prognostic significance of groin lymph node metastases in squamous carcinoma of the vulva. **Obstet Gynecol** 1985; 66:402e5.

Holschneider CH, Berek JS. **Câncer de vulva**. In: Berek JS, editor. **Tratado de ginecologia**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogen, 2002. p.1234-62.

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

Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science** 2001; 293:834-8.

Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:1611-22.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **International Association of Cancer Registries: cancer incidence in five continents, vol. VI**. Lyon: IARC Scientific Publ.; 1992.

International Federation of Gynecology and Obstetrics. Annual report on the results of treatment in gynaecologic cancer. **Int J Gynecol Obstet** 1989; 28:189e90.

Jones RW, Baranyai J, Stables S. Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. **Obstet Gynecol** 1997; 90:448-52.

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

Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:15524-9.

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; 62:212-8.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nat Genet** 2007; 39:673-7.

Kunej T, Godnic I, Horvat S, Zorc M, Calin GA. Cross talk between microRNA and coding cancer genes. **Cancer J** 2012; 18:223-31.

Lai EC, Wiel C, Rubin GM. Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes. **RNA** 2004; 10:171-5.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 1998. **CA Cancer J Clin** 1998;48:6-29.

Lanneau GS, Argenta PA, Lanneau MS, et al. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. **Am J Obstet Gynecol** 2009; 200:645.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 1993; 75:843-54.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J** 2004; 23:4051-60.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science** 2004; 303:95-8.

Mack GS. MicroRNA gets down to business. **Nat Biotechnol** 2007;25(6):631-8.

Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark. **Int J Cancer** 2008;122(12):2827-34.

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.

Maia BM, Rocha RM, Calin GA. Clinical significance of the interaction between non-coding RNAs and the epigenetics machinery: challenges and opportunities in oncology. **Epigenetics** 2014; 9:75-80.

Martínez-Palones JM, Pérez-Benavente MA, Gil-Moreno A, et al. Comparison of recurrence after vulvectomy and lymphadenectomy with and without sentinel node biopsy in early stage vulvar cancer. **Gynecol Oncol** 2006; 103:865-70.

Medeiros F, Nascimento AF, Crum CP. Early vulvar squamous neoplasia: advances in classification, diagnosis, and differential diagnosis. **Adv Anat Pathol** 2005; 12:20-6.

Meola N, Gennarino VA, Banfi S. microRNAs and genetic diseases. **Pathogenetics** 2009; 2:7.

Micheletti L, Preti M. Surgery of the vulva in vulvar cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2014; 28:1074-87.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2011: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. **Curr Opin Genet Dev** 2005; 15:563-8.

Monk BJ, Burger RA, Lin F, Parham G, Vasilev SA, Wilczynski SP. Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. **Obstet Gynecol** 1995; 85:709-715.

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

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** 2006; 24(Suppl 3):S1-S10.

[NCI] National Cancer Institute. **SEER stat fact sheets: vulvar cancer**. Available from: <URL: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html> > [2015 nov 11].

Nygård M, Hansen BT, Dillner J, et al. Targeting human papillomavirus to reduce the burden of cervical, vulvar and vaginal cancer and pre-invasive neoplasia: establishing the baseline for surveillance. **PLoS One** 2014; 9:e88323.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. **Nature** 2005; 435:839-43.

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

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. **Nature** 2010; 465:1033-8.

Preti M, Igidbashian S, Costa S, et al. VIN usual type-from the past to the future. **Ecancermedicalscience** 2015; 9:531.

Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ, Calin GA. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. **Pharmacol Ther** 2012; 136:169-74.

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

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.

Röther S, Meister G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. **Biochimie** 2011; 93:1905-15.

Scheistrøen M, Nesland JM, Tropé C. Have patients with early squamous carcinoma of the vulva been overtreated in the past? The Norwegian experience 1977-1991. **Eur J Gynaecol Oncol** 2002; 23:93-103.

Shah MY, Calin GA. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. **Nucleic Acid Ther** 2013; 23:2-8.

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.

Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. **Genes Dev** 2006; 20:2202-7.

Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. **Nat Commun** 2014; 5:4039.

Trimble EL, Lewis JL Jr, Williams LL, et al. Management of vulvar melanoma. **Gynecol Oncol** 1992; 45:254-8.

Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine** 2006; 24(Suppl 1):S1–S15.

Van de Nieuwenhof HP, Massuger LF, van der Avoort IA, et al. Vulvar squamous cell carcinoma development after diagnosis of VIN increases with age. **Eur J Cancer** 2009; 45:851-6.

Van de Velde N, Boily MC, Drolet M, et al. Population-level impact of the bivalent, quadrivalent, and nonavalent human papillomavirus vaccines: a model-based analysis. **J Natl Cancer Inst** 2012; 104:1712-23.

Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. **Cell** 2006; 124:1169-81.

Wagner M, Bennetts L, Patel H, Welner S, de Sanjose S, Weiss TW. Global availability of data on HPV genotypedistribution in cervical, vulvar and vaginal disease and genotype-specific prevalence and incidence of HPV infection in females. **Infect Agent Cancer** 2015; 10:1-6.

Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. **Nat Rev Drug Discov** 2013; 12:433-46.

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.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell** 1993; 75:855-62.

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

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

Woelber L, Mahner S, Voelker K, et al. Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. **Anticancer Res** 2009; 29: 545-52.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev** 2003; 17:3011-6.

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

ANEXOS

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso."

John Ruskin

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



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 09 de Janeiro de 2012.

Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha.

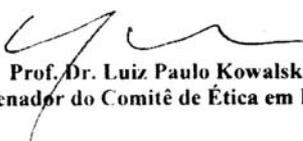
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1622/11
“Avaliação do papel de microRNAs em carcinomas de vulva na presença e ausência da infecção pelo vírus do HPV”.

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;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino - CIPE;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica 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