

---

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR  
IMUNOISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES DA  
FAMÍLIA ERBB NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE  
VULVA**

**ROSYANE RENA DE FREITAS**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para obtenção do Título de Doutora em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Glauco Baiocchi Neto**

**São Paulo**

**2018**

---

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Freitas, Rosyane Rena de

**Análise da expressão proteica por imunistoquímica dos receptores da família ErbB no carcinoma epidermóide de vulva** / Rosyane Rena de Freitas – São Paulo, 2018.

78p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Glauco Baiocchi Neto

Descritores: 1. Neoplasias Vulvares/Vulvar Neoplasms. 2. Carcinoma de Células Escamosas/Carcinoma, Squamous Cell. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Estudos Retrospectivos/Retrospective Studies. 5. Linfonodos/Lymph Nodes. 6. Metástase Neoplásica/Neoplasm Metastasis. 7. Receptores ErbB/ErbB Receptors.

## RESUMO

Freitas RR. **Análise da expressão proteica por imunohistoquímica dos receptores da família ErbB no carcinoma epidermóide de vulva.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** A identificação de receptores da família ERBB no câncer de vulva são pouco estudados e pode contribuir para o melhor conhecimento da doença e possível desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. **Objetivos:** 1. Avaliar a expressão imunohistoquímica e o papel prognóstico dos receptores da família ERBB no carcinoma epidermóide da vulva com metástase em linfonodos; 2. Correlacionar a expressão imunohistoquímica dos receptores da família ERBB com variáveis clínico-patológicas. **Pacientes e métodos:** Análise retrospectiva de 110 pacientes com carcinoma epidermóide da vulva com metástase inguinal tratadas no A.C.Camargo Cancer Center, entre janeiro de 1980 e fevereiro de 2010. Foram analisadas características clínicas, patológicas e de seguimento. A avaliação da expressão imunohistoquímica dos receptores da família ERBB foi realizada no tumor primário e nos linfonodos metastáticos. **Resultados:** Com relação às expressões imunohistoquímicas dos marcadores estudados nos tumores primários houve expressão de EGFR, HER2, HER3 e HER4 em 28,8%, 2,8%, 3% e 76,8% dos casos, respectivamente. Em relação às expressões imunohistoquímicas de EGFR e HER4 nos linfonodos inguinais metastáticos, foi positiva em 48,1% e 69,6% dos casos, respectivamente. Não houve expressão imunohistoquímica de HER2 e HER3 nos linfonodos inguinais metastáticos. Não foram encontradas relações entre as expressões imunohistoquímicas de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 entre os tumores primários e as metástases linfonodais. A expressão imunohistoquímica de HER-4 foi mais frequente em tumores <4cm (95%). Não houve relação estatisticamente significativa entre as expressões de EGFR, HER2 e HER3 e as variáveis anatomopatológicas. **Conclusões:** Houve expressão de EGFR, HER2, HER3 e HER4 nos tumores primários. A expressão imunohistoquímica de HER4 foi mais frequente em tumores <4cm . A expressão imunohistoquímica de receptores da família ERBB não teve impacto em sobrevida.

## SUMMARY

Freitas RR. [Analysis of protein expression by immunohistochemistry of ERBB family receptors in vulvar epidermoid carcinoma]. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introduction:** The identification of ERBB receptors in vulvar cancer is poorly studied and may contribute to a better knowledge of the disease and possible development of new treatment strategies. **Objectives:** 1. To evaluate the immunohistochemical expression and the prognostic role of ERBB family receptors in squamous cell carcinoma of the vulva with lymph node metastasis; 2. Correlate the immunohistochemical expression of the ERBB family of receptors with clinical-pathological variables. **Patients and methods:** Retrospective analysis of 110 patients with squamous cell carcinoma of the vulva with inguinal metastasis treated at the A.C.Camargo Cancer Center between January 1980 and February 2010. Clinical, pathological and follow-up characteristics were analyzed. The evaluation of the immunohistochemical expression of ERBB family receptors was performed on the primary tumor and metastatic lymph nodes. **Results:** Regarding the immunohistochemical expressions of the markers studied in the primary tumors, EGFR, HER2, HER3 and HER4 were expressed in 28.8%, 2.8%, 3% and 76.8% of the cases, respectively. Regarding the immunohistochemical expression of EGFR and HER4 in the metastatic inguinal lymph nodes, it was positive in 48.1% and 69.6% of the cases, respectively. There was no immunohistochemical expression of HER2 and HER3 in metastatic inguinal lymph nodes. No relationships were found between the immunohistochemical expressions of EGFR, HER-2, HER-3 and HER-4 between primary tumors and lymph node metastases. The immunohistochemical expression of HER-4 was more frequent in tumors <4cm (95%). There was no statistically significant relationship between EGFR, HER2 and HER3 expression and anatomopathological variables. **Conclusions:** There was expression of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in primary tumors. The immunohistochemical expression of HER4 was more frequent in tumors 4cm. The immunohistochemical expression of ERBB family receptors had no impact on survival.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Estrutura dos receptores da Família ERBB .....  | 12 |
| <b>Figura 2</b>  | Representação esquemática dos receptores EGFR, HER2, HER3 e HER4, homodímeros, heterodímeros e vias de sinalização..... | 14 |
| <b>Figura 3</b>  | Fotomicrografia exemplificando um carcinoma de células escamosas .....  | 28 |
| <b>Figura 4</b>  | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do EGFR no tumor primário da vulva (20x) .....              | 29 |
| <b>Figura 5</b>  | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do EGFR na metástase linfonodal (20x).....                  | 29 |
| <b>Figura 6</b>  | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER2 no tumor primário da vulva (20x).....               | 30 |
| <b>Figura 7</b>  | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER2 na metástase linfonodal (10x; 20x).....             | 30 |
| <b>Figura 8</b>  | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER3 no tumor primário da vulva (20x).....               | 30 |
| <b>Figura 9</b>  | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER3 na metástase linfonodal (10x; 20x).....             | 31 |
| <b>Figura 10</b> | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER4 no tumor primário da vulva (20x).....               | 31 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 11</b> | Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER4 na metástase linfonodal (20x).....              | 32 |
| <b>Figura 12</b> | Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário .....      | 44 |
| <b>Figura 13</b> | Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR na metástase linfonodal..... | 45 |
| <b>Figura 14</b> | Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário .....      | 45 |
| <b>Figura 15</b> | Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário .....      | 46 |
| <b>Figura 16</b> | Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário .....      | 46 |
| <b>Figura 17</b> | Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do HER4 na metástase linfonodal..... | 47 |
| <b>Figura 18</b> | Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário .....               | 49 |
| <b>Figura 19</b> | Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR na metástase linfonodal.....          | 50 |
| <b>Figura 20</b> | Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário .....               | 50 |
| <b>Figura 21</b> | Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário .....               | 51 |

---

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 22</b> | Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário .....       | 51 |
| <b>Figura 23</b> | Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER4 na metástase linfonodal ..... | 52 |

---

## LISTA DE TABELAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4 no câncer de vulva.....                            | 36 |
| <b>Tabela 2</b>  | Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4 na metástase linfonodal do câncer de vulva .....   | 37 |
| <b>Tabela 3</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário e na metástase linfonodal .....                 | 37 |
| <b>Tabela 4</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário e na metástase linfonodal .....                 | 37 |
| <b>Tabela 5</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário e na metástase linfonodal .....                 | 38 |
| <b>Tabela 6</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário e na metástase linfonodal .....                 | 38 |
| <b>Tabela 7</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas .....       | 39 |
| <b>Tabela 8</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do EGFR na metástase linfonodal com as variáveis anatomopatológicas ..... | 39 |
| <b>Tabela 9</b>  | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas .....       | 40 |
| <b>Tabela 10</b> | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas .....       | 40 |



|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 11</b> | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas .....                          | 41 |
| <b>Tabela 12</b> | Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER4 na metástase linfonodal com as variáveis anatomopatológicas .....                    | 41 |
| <b>Tabela 13</b> | Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das variáveis clinicopatológicas e expressões imunoistoquímicas nos tumores primários..... | 43 |
| <b>Tabela 14</b> | Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das expressões imunoistoquímicas nos tumores primários.....                                | 43 |
| <b>Tabela 15</b> | Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das expressões imunoistoquímicas das metástases linfonodais.....                           | 44 |
| <b>Tabela 16</b> | Taxas de sobrevida global (SG) em função das variáveis clinicopatológicas.....  | 48 |
| <b>Tabela 17</b> | Taxas de sobrevida global (SG) em função das expressões imunoistoquímicas nos tumores primários.....  | 48 |
| <b>Tabela 18</b> | Taxas de sobrevida global (SG) em função das expressões imunoistoquímicas das metástases linfonodais .....                                    | 49 |

# ÍNDICE

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1       | O Câncer de Vulva.....  | 1         |
| 1.2       | Receptores da Família ERBB .....  | 11        |
| 1.3       | Receptores da Família ERBB e Câncer .....   | 17        |
| 1.3.1     | EGFR .....  | 17        |
| 1.3.2     | HER2.....   | 17        |
| 1.3.3     | HER3 e HER4 .....   | 18        |
| 1.4       | Receptores da Família ERBB e Câncer de Vulva.....                                     | 19        |
| 1.4.1     | EGFR .....  | 19        |
| 1.4.2     | HER2.....   | 20        |
| 1.4.3     | HER3 e HER4 .....   | 20        |
| <b>2</b>  | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>3</b>  | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>4</b>  | <b>CASUÍSTICAS E MÉTODOS</b> .....  | <b>23</b> |
| 4.1       | Tipo de Estudo .....  | 23        |
| 4.2       | Métodos.....  | 23        |
| 4.2.1     | Coleta de Dados .....   | 23        |
| 4.2.2     | Variáveis Coletadas.....  | 23        |
| 4.2.3     | Critérios de Inclusão .....   | 25        |
| 4.2.4     | Critérios de Exclusão .....   | 25        |
| 4.2.5     | Determinação da Imunoistoquímica da Expressão dos Receptores da<br>Família ERBB ..... | 26        |
| <b>5-</b> | <b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>6-</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>34</b> |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 6.1      | Variáveis Clínicas e Demográficas .....   | 34        |
| 6.2      | Variáveis Anatomopatológicas .....  | 35        |
| 6.3      | Expressões Imunoistoquímicas do EGFR, HER2, HER3 e HER4 .....   | 36        |
| 6.4      | Correlação entress Expressões Imunoistoquímicas do EGFR, HER2,<br>HER3 e HER4 e as Variáveis Anatomopatológicas ..... | 38        |
| 6.5      | Dados do Seguimento .....   | 42        |
| 6.6      | Sobrevida Livre de Doença.....  | 42        |
| 6.7      | Sobrevida Global.....   | 47        |
| <b>7</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>8</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>9</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>63</b> |

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O CÂNCER DE VULVA

A incidência mundial de câncer de vulva é de 2,2 por 100 mil mulheres ao ano e tem aumentado cerca de 2% ao ano (PAL e BANDYOPADHYAY 2011). O *National Cancer Institute- NCI* identificou o câncer de vulva como um dos doze tipos de câncer com incidência crescente. De acordo com o *Surveillance, Epidemiology, and End Results-SEER em 2018*, estima-se que nos Estados Unidos, o câncer de vulva será responsável por quase 6% dos cânceres ginecológicos e 0,7% de todos os cânceres em mulheres. Nos Estados Unidos, as mulheres têm uma chance em 333 de desenvolver câncer de vulva em algum momento da vida. As estimativas da *American Cancer Society-ACS (2018)* para o câncer de vulva nos Estados Unidos em 2018 são: 6.190 casos diagnosticados e 1.200 óbitos.

O câncer de vulva constitui doença debilitante e freqüentemente é diagnosticado tardiamente, apesar de ser manifestação da genitália externa feminina. Em geral acomete pacientes do grupo etário avançado, dentre as quais 90% encontram-se acima dos 50 anos (ABRÃO e ABRÃO 1995), com um pico de incidência ao redor dos 66 anos (GIRÃO et al. 1995), contudo, em torno de 12% a 15% dos casos ocorre em mulheres jovens, antes dos 45 anos (DISAIA e CREASMAN 1989; NILSSON et al. 1990). O pudor, principalmente nas classes sociais menos favorecidas, pode retardar a procura do médico pela paciente (ABRÃO e ABRÃO 1995). Em alguns casos, pode ocorrer também falha na

avaliação, quando o tumor está em sua fase incipiente (GIRÃO et al. 1995). Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico frequentemente é feito em estádios mais avançados (PEREZ e GRIGSBY 1992), chegando a 84% dos casos nos estádios III e IV (TORRES LOBATON et al. 1983). Nos países desenvolvidos o diagnóstico nos estádios III e IV oscila entre 18,5 e 49% (SHANBOUR et al. 1992) e, no Brasil, a descoberta de casos nos estádios III e IV ocorre em 36% a 57% das pacientes (ABRÃO et al. 1990, SOUEN et al. 1992).

No Brasil, em estudo retrospectivo realizado com 300 prontuários de pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de vulva e tratados cirurgicamente no AC Camargo Cancer Center em São Paulo, Brasil, no período de 1978 a 2009, a mediana da idade de início foi de 70 anos, variando de 15 a 98 anos. A maioria das mulheres era branca (88,5%), teve pouca ou nenhuma escolaridade (83,5%) e apresentou a menor curva de sobrevida. Muitas pacientes foram diagnosticadas nos estádios iniciais da doença (57% FIGO IB), 59% tiveram complicações devido à cirurgia e 43,7% tiveram recidiva da doença, das quais cerca de 70% morreram. Esse estudo adiciona 300 casos brasileiros de carcinoma de vulva à literatura mundial (DE MELO MAIA et al. 2013).

Embora raro, o câncer de vulva tem mau prognóstico quando avançado. Pacientes que apresentam disseminação regional (31%) e metástases à distância (5%) têm pior prognóstico, com sobrevida em 5 anos de 57% e 17%, respectivamente (SIEGAL et al. 2017; PALISOUL et al. 2017). Isto é principalmente devido a opções terapêuticas limitadas.

Com exceção aos raros sarcomas de vulva, o pico de incidência é em mulheres entre 65 e 75 anos. Classicamente é uma doença de pacientes idosas, no

entanto, recentemente observamos um aumento da incidência em pacientes mais jovens, fatores relacionados ao HPV, doenças pré-invasivas e tabagismo. Neoplasias de vulva relacionadas ao HPV são raras em pacientes idosas, sendo mais relacionadas à distrofia vulvar e líquen escleroso, embora a direta associação ainda não possa ser provada. Raça e paridade não foram relacionadas. Pacientes jovens frequentemente apresentam invasão estromal precoce com neoplasia intraepitelial difusa da pele da vulva. Cerca de 30-40% das lesões invasivas da vulva, se relacionam ao HPV. Esse efeito é mais pronunciado nos casos de tabagismo e pacientes imunocomprometidas. Em uma casuística do A.C.Camargo Cancer Center, no Brasil, a infecção pelo HPV foi confirmada em 32,8% dos casos (LAVORATO-ROCHA et al. 2013). Estudos anteriores sobre câncer de vulva relataram infecção por HPV em 9% a 57% dos casos, dependendo da população e do método de detecção utilizado (BRANDENBERGER et al. 1992; LEE et al. 1994; IWASAWA et al. 1997; LERMA et al. 1999; BIEDERMANN et al. 2004; KNOPP et al. 2006).

Com relação aos sintomas, é frequente a queixa de longo tempo de prurido associado à distrofia da vulva, menos comumente, sangramento, tumor palpável, dor local, ulceração, disúria e secreção purulenta. A maioria das séries reportam um tempo de 2 meses a 16 meses do início dos sintomas para a suspeita diagnóstica (GIRÃO et al. 1995).

Com relação à localização, a maioria dos tumores de vulva incidem no lábio maior, mas o lábio menor, períneo e clitóris também podem ser sítio primário. Aproximadamente 10% dos casos são extensos, impossibilitando determinar o local de origem e aproximadamente 5% são multifocais (GIRÃO et al. 1995)

Com relação ao comprometimento dos linfonodos, sabe-se que no câncer de vulva, o envolvimento linfonodal é o fator prognóstico mais importante para sobrevida global e livre da doença. A sua presença pode ser unilateral ou bilateral, sendo a última mais associada a tumores de linha média. A sobrevida em 5 anos reduz de 90% para 40-50% na presença desta forma de disseminação. Pacientes com metástase em linfonodos apresentam risco de recorrência cinco vezes maior do que sem esta disseminação. No caso de metástase bilateral o risco de recorrência chega a ser 17 vezes maior. A redução de sobrevida também é demonstrada quanto maior o número de linfonodos positivos e ainda na presença de metástases bilaterais. Quanto maior a extensão do comprometimento linfonodal inguinal, maior o risco de doença linfonodal pélvica e, com isto, a sobrevida reduz para 18-22% em cinco anos. Dada a importância da metástase linfática, a sua avaliação precisa no estadiamento é de fundamental importância (BURGER et al. 1995).

Estudo realizado no A.C.Camargo Cancer Center, mostrou que a ressecção de menos de 12 linfonodos na linfadenectomia bilateral para pacientes com câncer de vulva e linfonodos inguinais positivos tem um impacto negativo na recorrência e morte por câncer. Ressecção de pelo menos 12 linfonodos deve ser considerado o objetivo para as pacientes com câncer de vulva que requerem linfadenectomia bilateral (BAIOCCHI e CESTARI 2013). Outro estudo do mesmo hospital corrobora com evidências atuais de pior prognóstico nos casos de múltiplos linfonodos comprometidos. Os dados também sugerem que, em relação aos resultados, as pacientes com linfonodos positivos são melhor categorizadas em 2 grupos: aquelas com 1 e 2 linfonodos positivos e 3 ou mais linfonodos positivos (BAIOCCHI e SILVA CESTARI 2013).

Com relação à recorrência, alguns fatores prognósticos estão diretamente relacionados. Esta neoplasia pode se disseminar a partir do sítio inicial por meio da invasão local de tecido adjacente ao tumor primário; por meio da embolização para linfonodos regionais, usualmente inguinais superficiais e profundos e eventualmente pélvicos; e por via hematogênica, muito raramente, atingindo pulmões, fígado e ossos (DISSAIA e CREASMAN 1989). Conforme já discutido, a mais importante via de disseminação é a linfática, realizada por meio da embolização, sendo, portanto fundamental o estudo histopatológico dos linfonodos regionais nos casos de tumores invasores (ONNIS et al. 1992; ROSE 1999). No entanto, a vulva apresenta-se como o principal sítio de recorrência para o câncer de vulva, apesar das recorrências inguinais apresentarem-se mais precocemente e com pior prognóstico, quando comparadas às primeiras (HOPKINS et al. 1990).

Com relação ao tratamento, o padrão instituído para o câncer de vulva em estágio inicial é o cirúrgico, constituído por excisão radical do tumor associado à linfadenectomia inguinfemoral (PODRATZ et al. 1983).

Tal abordagem, apesar de se encontrar relacionada a significativa morbidade, demonstra bons resultados em termos de recorrência inguinal (as taxas de recorrência podem variar de 1% a 10%) (HACKER et al. 1981; DE HULLU et al. 2002). Entretanto, somente um pequeno número de pacientes se beneficiará da realização da linfadenectomia inguinfemoral, uma vez que apenas 25% a 35% apresentarão metástases para linfonodos (BELL et al. 2000; KATZ et al. 2003). Desta maneira, mais de 75% das pacientes serão desnecessariamente submetidas a procedimento correlacionado a significativa morbidade, tais como linfedema de membros inferiores, infecção e erisipela (ROUZIER et al. 2003). Por conseguinte, técnicas não



invasivas ou minimamente invasivas são desejáveis, com o intuito de acessar a possibilidade de metástases para linfonodos.

A partir de 1977, com a introdução da dissecação do linfonodo sentinela no arsenal terapêutico do câncer de pênis, inúmeros estudos vêm demonstrando a segurança no diagnóstico de metástases para linfonodos a partir da pesquisa do linfonodo sentinela como no câncer de mama e melanoma (MORTON et al. 1992; CABANAS 1977; SONI e SPILLANE 2005). Da mesma maneira, tem-se demonstrado resultados semelhantes na pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de vulva (MOORE et al. 2003). Em estudo prospectivo observacional, pacientes com faixa etária média de 64 anos, diagnosticadas com carcinoma de vulva estádios I ou II (66% e 22%, respectivamente) e invasão superior a 1,0 mm, foram submetidas a tratamento cirúrgico constituído por vulvectomia radical ou excisão radical ampla da lesão associadas à dissecação do linfonodo sentinela unilateral (em pacientes com lesão distando mais do que 1,0 cm da linha média) ou bilateral (lesão distando menos que 1,0 cm da linha média). Após avaliação histopatológica dos linfonodos sentinela ressecados, pacientes identificadas como portadoras de metástase linfonodal foram submetidas à ressecção completa da região inguinal. Observou-se, no período de seguimento médio de 29 meses, que 6,4% das pacientes com linfonodo sentinela negativo apresentaram recorrência inguinal (MOORE et al. 2008).

O estudo *GRONingen International* sobre linfonodos sentinela no câncer de vulva (GROINSS-V) (OONK et al. 2010) estudou pacientes com câncer de vulva unifocal medindo menos de 4cm, permitindo que aquelas com linfonodo sentinela negativo fossem acompanhadas, enquanto aquelas com linfonodos sentinela positivos

fossem submetidas a linfadenectomia inguinofemoral. O desenho do estudo de GROINSS-V diferiu de estudos anteriores, pois muitos estudos prévios realizaram biópsia de linfonodo sentinela seguida de linfadenectomia inguinofemoral para determinar o valor preditivo negativo de dissecação de linfonodo sentinela (LEVENBACK et al. 2012). Este estudo demonstrou que pacientes com linfonodos sentinela negativos apresentaram baixas taxas de recorrência inguinal, mínima morbidade do procedimento do linfonodo sentinela e excelente sobrevida (VAN DER ZEE et al. 2008). Estudos anteriores evidenciaram taxa de recorrência inguinal após linfadenectomia inguinofemoral superficial de 5-7% (STEHMAN et al. 1992, 1996). O estudo internacional GROINSS-V relatou uma taxa de recorrência inguinal de 2,3% (VAN DER ZEE et al. 2008) em tumores unicêntricos. No GROINSS-V, a doença metastática foi identificada em um ou mais linfonodos sentinelas em 135 (33%) dos 403 pacientes. O risco de metástases não-sentinela foi maior quando o linfonodo sentinela foi encontrado como positivo já na hematoxilina-eosina em comparação à imuno-histoquímica (27% vs 5,3%,  $p = 0,001$ ). A proporção de pacientes com metástases não-sentinela aumentou com o tamanho da metástase do linfonodo sentinela: em 4,1% (1/24) dos casos com células tumorais individuais houve metástase em linfonodo não-sentinela; 10,5% (2/19) com metástases de 2 mm ou menos; 13% (2/15) com metástases entre 2 mm e 5 mm; e 47,6% (10/21) com metástases maiores que 5 mm. A sobrevida câncer específica para pacientes com metástases de linfonodo sentinela maiores que 2 mm foi menor que para aquelas com metástases de linfonodo sentinela de 2 mm ou menos (69,5% vs 94,4%,  $p = 0,001$ ). Portanto, todas as pacientes com metástases nos linfonodos sentinela devem ter tratamento adicional com linfadenectomia inguinal. O prognóstico para pacientes

com metástase do linfonodo sentinela maior que 2 mm é ruim, e novos esquemas de tratamento devem ser explorados para esses pacientes (OONK et al. 2010).

As complicações pós-operatórias também foram menores com a biópsia do linfonodo sentinela em comparação com a dissecação inguinfemoral. Em doentes tratadas apenas com biópsia do linfonodo sentinela, foi notificado linfedema entre 2-9% e sete em 100 (7%) pacientes tiveram complicações da ferida, incluindo infecção, linfocele ou deiscência (VAN DER ZEE et al. 2008, ROBISON et al. 2014). Além disso, a biópsia de linfonodo sentinela foi associada a uma melhora na qualidade de vida (ROTTMANN et al. 2016).

Numerosos estudos demonstraram o benefício da biópsia do linfonodo sentinela no tratamento cirúrgico do câncer de vulva. Em centros com cirurgiões experientes, a biópsia do linfonodo sentinela deve ser considerada um tratamento padrão e uma alternativa à linfadenectomia inguinfemoral em pacientes com exame clínico negativo inguinal e com um índice de tumor unifocal <4 cm. Para aumentar a taxa de detecção e a sensibilidade dos linfonodos sentinela, tanto o radiocoloide quanto o corante são recomendados para o mapeamento. Se o tumor primário estiver a 2 cm ou mais da linha média, uma biópsia de linfonodo sentinela unilateral é apropriada. Para um tumor primário dentro de 2 cm da linha média, uma biópsia de linfonodo sentinela bilateral é recomendada. No caso de um linfonodo sentinela não ser identificado, recomenda-se a linfadenectomia inguinfemoral (LEVENBACK et al. 2012; GREER et al. 2016). A biópsia de linfonodo sentinela é viável, custo-efetiva e associada à diminuição da morbidade e complicações da ferida; tudo isso sem mostrar impacto negativo na recorrência ou sobrevida.

Com relação ao tratamento adjuvante, é indicado em: (1) qualquer macrometástase de linfonodo maior ou igual a 5 mm com radioterapia adjuvante; (2) duas ou mais micrometástases de linfonodos menores de 5 mm com radioterapia adjuvante, incluindo campos inguinal e pélvico e, (3) em qualquer disseminação extracapsular com radioterapia adjuvante com 45 Gy em 25 frações (HOMESLEY et al. 1986). Uma análise da *National Cancer Data Base (NCDB)* de 1797 pacientes com câncer de vulva submetidas a cirurgia com envolvimento nodal inguinal confirmado tratadas com radioterapia adjuvante concluiu que a adição de quimioterapia adjuvante resultou em uma redução de 38% no risco de mortalidade. A sobrevida mediana não ajustada com e sem quimioterapia adjuvante foi de 44,0 versus 29,7 meses, respectivamente ( $P = 0,001$ ) (GILL et al. 2015).

Quanto ao tratamento do câncer de vulva avançado, este ainda constitui um problema, já que a doença ainda é considerada relativamente quimiorresistente e o tratamento cirúrgico é extremamente agressivo. No entanto, recentemente, estudos fase II têm mostrado alguma resposta à quimioterapia neoadjuvante (ARAGONA et al. 2012). Por outro lado, radioterapia e quimioterapia primárias em doença avançada também mostrou algum resultado em estudos fase II (MOORE et al. 2012), com redução da morbidade com objetivo de evitar exenterações. No entanto, o tratamento ainda cursa com alta morbidade na atualidade (READE et al. 2014).

Em resumo, a cirurgia é a base para estadiamento e tratamento do câncer de vulva. A doença em estágio inicial tem uma boa resposta. O prognóstico e o tratamento devem ser individualizados. O tumor primário pode ser tratado com segurança com ressecção local ampla com margens cirúrgicas pretendidas de 2 cm e margem patológica final de pelo menos 1 cm. No caso de lesão suspeita ou doença

multifocal, vulvectomia radical deve ser realizada. Para pacientes com doença unifocal, tumor inferior a 4 cm clinicamente e com exame clínico negativo da região inguinal, pesquisa do linfonodo sentinela deve ser oferecida (corante azul e linfocintilografia). No caso de linfonodo clinicamente positivo ou linfonodo sentinela positivo, linfadenectomia inguinal radical deve ser realizada. A quimiorradiação neoadjuvante é indicada para tumores avançados que só poderiam ser primariamente ressecados por procedimentos de exenteração (BAIOCCHI e ROCHA 2014).

Neste sentido, além dos indicadores prognósticos anatomopatológicos já estudados no câncer de vulva, que corroboram para a associação de modalidades terapêuticas conhecidamente agressivas, a identificação de marcadores moleculares presentes nestes tumores pode contribuir para a elaboração de estratégias menos mutilantes e com menores efeitos adversos no tratamento.

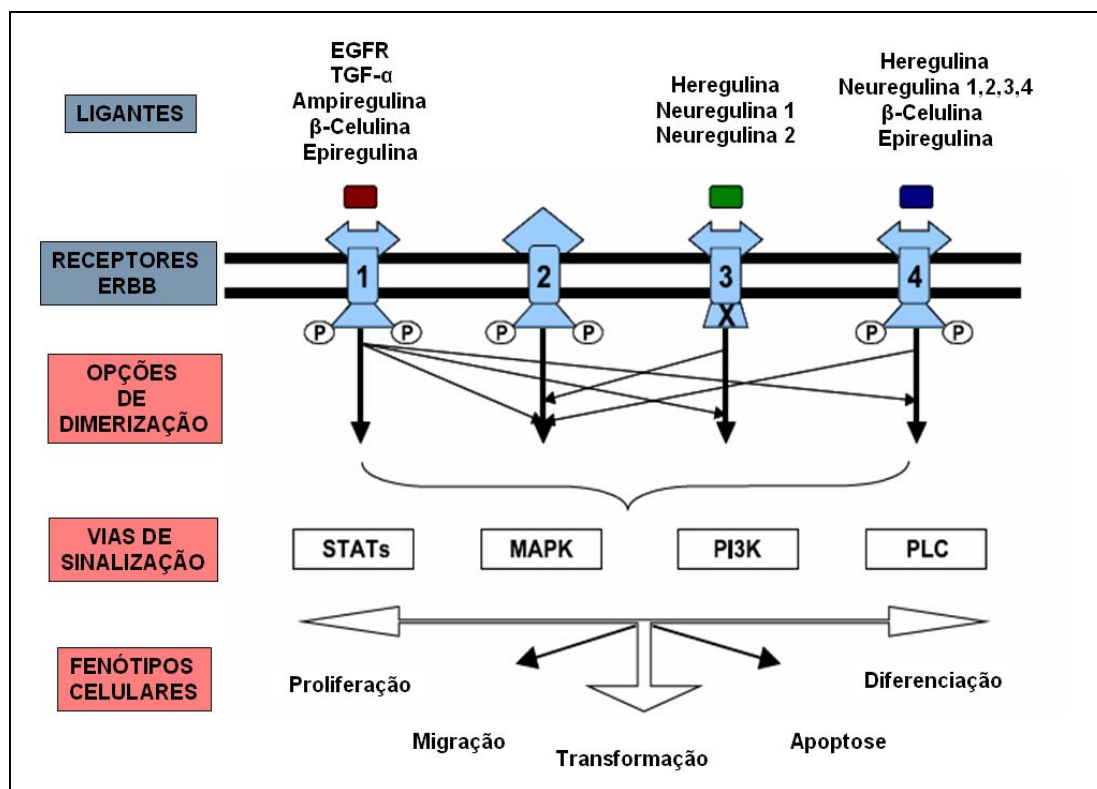
Até o momento, pouco se sabe sobre novos biomarcadores com um prognóstico real ou papel preditivo em carcinomas de vulva. RICHARD et al. em 2008, publicaram um dos poucos trabalhos da literatura neste contexto, relatando um caso de tratamento de carcinoma de vulva metastático recorrente com cisplatina associado ao cetuximab (inibidor do EGFR) com resultados paliativos satisfatórios. No entanto, o tratamento de escolha para esta condição ainda é cirúrgico e a metástase linfonodal é o fator prognóstico mais importante (DE MELO MAIA et al. 2013) e pouco tem sido feito em relação à descoberta de fatores prognósticos que podem de fato proporcionar uma melhor qualidade de vida psicossocial para mulheres diagnosticadas com este tumor.

A este respeito, novos conceitos de tratamento são necessários como terapia para esta doença que muitas vezes envolve procedimentos mutilantes, promovendo

efeitos negativos sobre os aspectos psicossociais de qualidade de vida para as mulheres afetadas com este tipo de câncer.

## **1.2 RECEPTORES DA FAMÍLIA ERBB**

A família de proteínas ErbB tem seu nome originado na homologia com o Produto Gênico da Eritroblastose Viral (*v-erbB*). Trata-se de receptores de membrana tipo I, cuja função é ativar a via de sinalização intracelular em resposta ao sinal extracelular e é formada por quatro receptores: EGFR/ERBB1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 e ERBB4/HER4 (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005). O complexo de receptores ERBB é uma das vias de transmissão de sinal celular mais amplamente estudada e um exemplo do poder biológico de um sinal aberrante (CITRI e YARDEN 2006). A estrutura de cada um dos receptores está representada na Figura 1.



Fonte: Adaptado de GRANDIS e SOK (2004)

**Figura 1** - Estrutura dos receptores da Família ERBB.

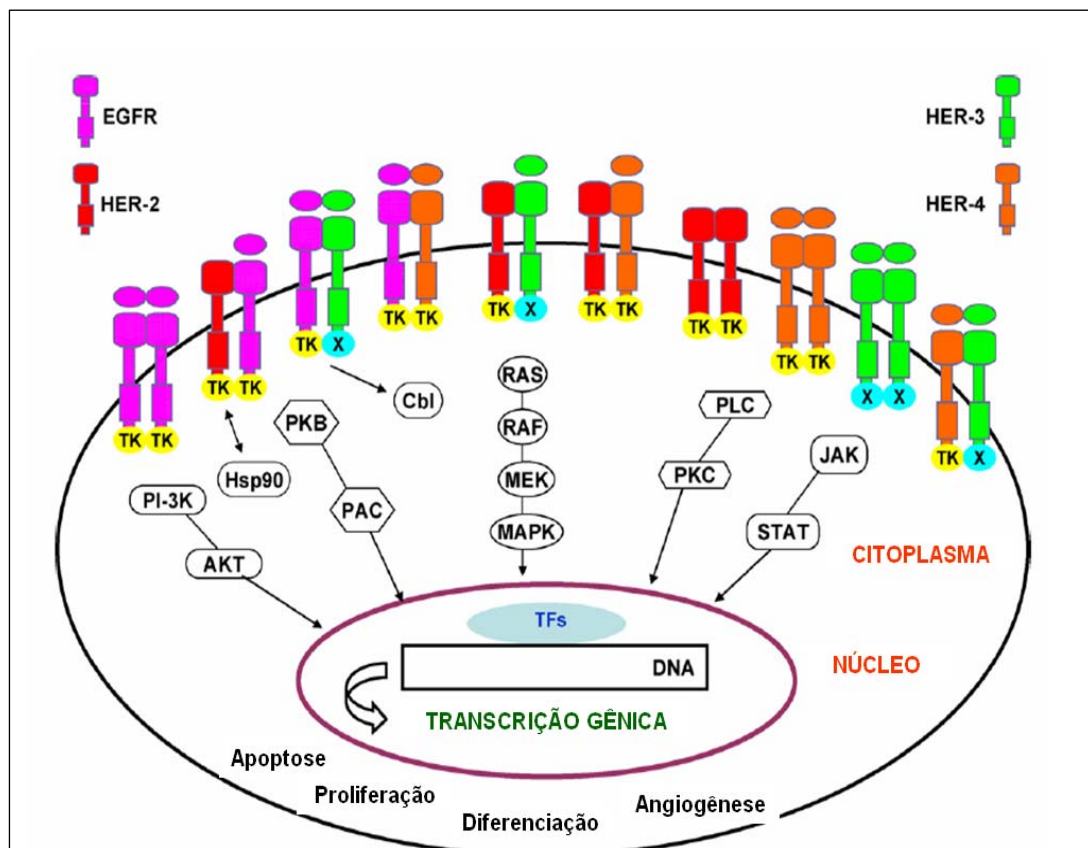
Todos os membros da família possuem um domínio extracelular, onde se encontram 13 polipeptídeos como sítio de ligação para a molécula sinalizadora, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático com atividade tirosinaquinase. O domínio extracelular das proteínas ERBB pode apresentar-se sob a conformação inibida ou sob a conformação ativa (FINNEGAN e CAREY 2007; MOASSER 2007). Apesar da família ERBB ser considerada um protótipo no que se refere a atividade tirosinaquinase, dois membros da família (ERBB2 e ERBB3) não tem atividade autônoma (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005; CITRI e YARDEN 2006).

São conhecidas pelo menos 30 moléculas sinalizadoras, que geralmente são pequenas proteínas secretadas pela célula no espaço intercelular, denominados fatores de crescimento. Todos os fatores de crescimento são sintetizados a princípio como precursores ancorados à membrana e de forma subsequente são liberados da célula por proteólise (HYNES e LANE 2005; FINNEGAN e CAREY 2007).

A interação entre o receptor e o seu fator de crescimento, inicia uma mudança na conformação do seu domínio extracelular de inativo para ativo e promove sua dimerização. Cada receptor homodimérico ou heterodimérico inicia uma complexa cascata de sinalização, que resulta na proliferação celular, diferenciação, migração, adesão e transformação. A seleção de parceiros para dimerização determina a atividade sinalizadora entre as proteínas ERBB (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HYNES e LANE 2005; MOASSER 2007).

As duas maiores vias de sinalização da família ERBB é a RAS-RAF-MAPK e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/AKT) (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005). RAS-RAF-MAPK (proteína quinase mitógeno ativado) são um grupo de serina-treonina quinases que regulam a proliferação celular, sobrevivência e migração no câncer. A PI3K/AKT também é uma serina-treonina quinase. Através de várias etapas intermediárias, a PI3K ativa a enzima AKT, que então age sobre fatores de transcrição no núcleo, regulando as vias de sinalização da apoptose, expressão gênica e proliferação celular (MENDELSON e BASELGA 2000; YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005). Estas vias de sinalização estão resumidas na Figura 2.





**Fonte:** Adaptado de KARAMOUZIS et al. (2007).

**Figura 2** - Representação esquemática dos receptores EGFR, ERBB2, ERBB3 e ERBB4, homodímeros, heterodímeros e vias de sinalização.

Nas células tumorais, a família de receptores ERBB são ativados por vários mecanismos, incluindo a mutação, a superexpressão e produção autócrina e parácrina dos fatores de crescimento. Na estimulação parácrina dos receptores ERBB, os fatores de crescimento são liberados pelas células do estroma, enquanto que a estimulação autócrina resulta da liberação dos fatores de crescimento ancorados na membrana celular (HYNES e LANE 2005). Os ligantes da família ERBB podem ser divididos em 3 grupos: o primeiro inclui o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação de crescimento alfa (TGF-alfa) e ampirregulina que ligam ao

EGFR. O segundo grupo inclui betacelulina, ligante de heparina – EGF e epiregulina que mostram dupla especificidade e se ligam ao EGFR e ERBB4. O terceiro grupo é composto pelas neuregulinas, sendo que as neuregulinas 1 e 2 se ligam ao ERBB3 e ERBB4 e as neuregulinas 3 e 4 apenas ao ERBB4.

O ERBB2 é o único receptor que possui uma conformação do domínio extracelular fixa e que remete a forma ativa, mesmo na ausência de um ligante. É o parceiro preferido para dimerização do EGFR, ERBB3 e ERBB4. A dimerização com ERBB2 aumenta a capacidade transformante de outros receptores da família ERBB (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; FINNEGAN e CAREY 2007; MOASSER 2007). Há uma hierarquia no que se refere à potência do sinal em relação aos dímeros. Os heterodímeros são mais ativos que os homodímeros. Os heterodímeros que contêm ERBB2 são particularmente mais ativos e o heterodímero ERBB2-ERBB3 é considerado como o que confere o sinal mais intenso (SERGINA e MOASSER 2007).

O aumento da expressão protéica do ERBB2, seja por amplificação gênica ou através da desregulação transcricional, ocorre em aproximadamente 25 a 30% dos casos de câncer de mama e ovário e confere pior comportamento biológico. No caso do câncer de mama a superexpressão está relacionada a com tamanho do tumor, metástase linfonodal, pior grau histológico, aneuploidia, ausência de receptores de estrógeno e maior índice proliferativo (SLAMON et al. 1987; ROSS e FLETCHER 1998). A amplificação do gene ERBB2 parece ser um evento precoce durante a carcinogênese do câncer de mama, sendo demonstrado em cerca de 50% dos carcinomas ductais *in situ* (BADRA et al. 2006). O ERBB2 é mantido durante a progressão para doença invasiva e metástase. A superexpressão e amplificação do

ERBB2 também ocorrem no câncer gástrico, esofágico e endometrial (MOASSER 2007).

Assim como o ERBB2, o ERBB3 não tem atividade como receptor isolado. O ErbB3 não tem atividade tirosinaquinase funcionante em seu domínio intracelular. Somente adquire potencial de sinalização quando ocorre dimerização com outro receptor da família ERBB. Nenhuma alteração genômica significativa foi encontrada até o momento em neoplasias em relação ao ERBB3 (JEONG et al. 2006). Porém esse fato não exclui sua função na ativação de tumores associados ao EGFR e ERBB2. A superexpressão de ERBB3 é encontrada em 20-30% dos carcinomas invasivos de mama, em cerca de 1/3 dos carcinomas *in situ* e está associado a um pior prognóstico (BADRA et al. 2006). A superexpressão simultânea de ERBB2 e ERBB3 em carcinomas invasores de mama é encontrada em 12-50% dos casos e o aumento da resistência a drogas em carcinomas com superexpressão de ERBB2 está relacionada com a superexpressão de ERBB3 e/ou EGFR (KARAMOUZIS et al. 2007).

O ERBB4 é o receptor menos caracterizado da família ERBB. Em contraste com o ERBB3, o ERBB4 pode ser ativado tanto pelos ligantes da família das neuregulinas quanto dos fatores de crescimento epidérmico (EGF). Algumas evidências não implicam sua atividade com a tumorigênese (SARTOR et al. 2001). A sua expressão no câncer de mama é menos freqüente que dos outros receptores da família. Porém sua expressão está relacionada com um aumento de positividade de receptores de estrógeno, maior diferenciação e menor proliferação. Estudos de linhagens celulares mostraram que a homodímeros de ERBB4 estimulados por neuregulina estimula apenas a via de apoptose controlada pela PI3K-AKT e não

estimula a via de proliferação celular (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001), denotando um paradoxo em sua superexpressão.

### **1.3 RECEPTORES DA FAMÍLIA ERBB E CÂNCER**

#### **1.3.1 EGFR**

Tanto a superexpressão quanto a alteração estrutural do EGFR são encontradas em diversas neoplasias. A superexpressão de EGFR é frequente em tumores cerebrais e encontradas em 40% dos gliomas. É também detectada nas lesões pré-malignas do epitélio oral, pulmão, próstata e colo uterino (GRANDIS e SOK 2004). A mutação mais comum (tipo III) é a deleção de parte do domínio extracelular, que torna o receptor estruturalmente ativo (WONG et al. 1992).

#### **1.3.2 HER2**

A super-expressão de HER2 ocorre em 20-25% dos tumores malignos de mama e está associada a doença mais agressiva, com maior grau e maior propensão para o desenvolvimento de metástases à distância, o que leva a maior risco de morte pelo câncer (NAHTA e ESTEVA 2003). Estudos pré-clínicos mostraram que a agressividade mediada pela presença do HER2 pode ser revertida através do uso de anticorpos monoclonais contra o receptor do HER2 (HANCOCK et al. 1991; PIETRAS et al. 1995). Estudos clínicos subsequentes confirmaram a efetividade do trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga com alta afinidade ao sítio extra-celular da proteína HER2, no tratamento do câncer de mama avançado HER2-positivo (SLAMON et al. 2001; PEGRAM et al. 2004).

Da mesma forma, a descoberta da amplificação/super-expressão do HER2 no câncer gástrico foi um passo importante tanto na melhor compreensão da carcinogênese desse tumor, quanto na utilização deste receptor como um alvo terapêutico eficaz. Acredita-se que também neste tumor, a positividade do HER2 esteja relacionada a um pior prognóstico (GRAVALOS e JIMENO 2008).

### **1.3.2 HER3 e HER4**

O significado prognóstico e a utilidade terapêutica potencial do HER3 e HER4 ainda não estão estabelecidos. Até o momento, alguns grupos têm avaliado a frequência de expressão e as associações clinicopatológicas de toda a família ERBB no câncer de mama.

Relatos sobre a incidência de HER3 e HER4 variam amplamente na literatura atual. Estudos utilizando imunistoquímica em tecido embebido em parafina relataram superexpressão de HER3 em de 13,8% para 75% dos cânceres de mama (TRAVIS et al. 1996; WITTON et al. 2003) A superexpressão de HER4 por câncer de mama tem sido identificada em 11,8% para 82% dos casos na literatura atual, embora a maioria dos estudos têm relatado mais de 45% dos casos de superexpressão de HER4 (SUO et al. 2001; VAN der HORST et al. 2005; LEE et al. 2007; AUBELE et al. 2007; SASSEN et al. 2008; ZACZEK et al. 2008).

Além disso, a superexpressão de HER3, mas não de HER4, também foi significativamente associada com a diminuição da sobrevida câncer de mama-específica.

Historicamente, HER3 tem representado um desafio para o desenvolvimento de medicamentos devido à falta de actividade da tirosina-cinase deste receptor. No entanto, relatos recentes de medicamentos direcionados ao HER3 têm mostrado

resultados promissores no cenário pré-clínico. Em um estudo pré-clínico descrito por van der VAN DER HORST et al. (2005), o tratamento com a droga  $\alpha$ -HER-3ECD, um anticorpo monoclonal contra HER3, resultou numa redução significativa na taxa de proliferação e migração de linhas celulares de câncer de mama que exibiu níveis normais de expressão do HER2.

## **1.4 RECEPTORES DA FAMÍLIA ERBB E CÂNCER DE VULVA**

### **1.4.1 EGFR**

Vários estudos têm abordado a proteína EGFR e expressão gênica em câncer de vulva. Tanto a superexpressão quanto a alteração estrutural da proteína EGFR, membro da família ERBB de receptores de membrana tipo I, já foram encontradas em diversas neoplasias (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001). Em carcinomas de vulva, JOHNSON et al. (1997), constataram aumento progressivo na expressão desta proteína a partir do epitélio benigno da vulva para o tecido maligno primário e, então, para lesões metastáticas na mesma paciente. Além disso, a expressão elevada de EGFR no tumor maligno primário da vulva parece estar significativamente associada com a diminuição da sobrevida das pacientes e pior prognóstico (WOELBER et al. 2012).

Um estudo publicado no início dos anos 90 abriu novas vias de investigação nesta área, mas nenhuma relevância prognóstica para o EGFR foi obtida na época (BERCHUCK et al. 1990). Em 1997, JOHNSON et al. mostraram uma relação entre a positividade de EGFR com a presença de metástase e sobrevida do paciente. A partir de então, muitos estudos têm mostrado uma ligação entre o EGFR com mau prognóstico no cancer da vulva devido à sua correlação com a presença de metástase

linfonodal (OONK et al. 2007), diminuição da sobrevida (JOHNSON et al. 1997; GROWDON et al. 2008), estadiamento tumoral (GROWDON et al. 2008), a progressão da doença (BRUSTMANN 2007) e ausência de infecção por HPV (GROWDON et al. 2008). O aumento do número de cópias do gene EGFR foi recentemente associado com metástases linfonodais, estadiamento tumorais avançados, fenótipos não – basalóides e ausência de infecção pelo HPV, o que tornam por conduzir a um mau prognóstico neste tipo tumoral (OONK et al. 2007).

Dessa forma, o EGFR tem sido amplamente descrito, não só como um marcador de prognóstico da neoplasia da vulva, como mostrado anteriormente, mas também como uma ferramenta poderosa para a previsão da resposta terapêutica e terapia-alvo. A avaliação deste marcador em linfonodos metastáticos assim como no tumor primário ainda necessita ser avaliada a fim de predizer também, além de prognóstico, uma possível modalidade terapêutica a ser utilizada nos casos de comprometimento linfonodal.

#### **1.4.2 HER2**

Apesar de ainda não existir protocolos específicos como para mama e estômago, a positividade para receptores HER2 tem sido relatada no câncer de vulva. GORDINER et al. 1997, mostraram a associação de tumores de vulva metastáticos com positividade do HER2 em tumores primários. No entanto, atualmente não há estudos clínicos relativos à eficácia de terapias anti-HER2 em carcinomas da vulva.

#### **1.4.3 HER3 e HER4**

Com relação ao câncer de vulva, não existem ainda estudos quanto a estes receptores.

## **2 OBJETIVOS**

- 1 Avaliar a expressão imunoistoquímica de EGFR, HER2, HER3 e HER4 no carcinoma epidermóide da vulva (tumor primário) e nos linfonodos inguinais metastáticos, e correlaciona-la com as variáveis clínico-patológicas.
  
- 2 Avaliar o papel prognóstico da expressão imunoistoquímica de EGFR, HER2, HER3 e HER4 no carcinoma epidermóide da vulva com metástase inguinal.



### **3 JUSTIFICATIVA**

Além dos indicadores prognósticos anatomopatológicos já estudados no câncer de vulva, que corroboram para a associação de modalidades terapêuticas conhecidamente agressivas, a identificação de marcadores moleculares presentes nestes tumores pode contribuir para a elaboração de novas estratégias de tratamento e com menos efeitos adversos no tratamento. Novos conceitos de tratamento são necessários como terapia para esta doença que muitas vezes envolve procedimentos mutilantes, promovendo efeitos negativos sobre os aspectos psicossociais de qualidade de vida para as mulheres afetadas com este tipo de câncer. Além disso, o tratamento sistêmico com drogas molécula alvo ainda foi pouco investigado no câncer de vulva.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

Estudo retrospectivo longitudinal

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Coleta de Dados**

Esta análise retrospectiva incluiu 234 pacientes com tumor primário de vulva e destes 110 pacientes com linfonodos positivos para metástase que foram submetidas a tratamento cirúrgico, incluindo linfadenectomia inguinal, no Departamento de Ginecologia Oncológica, do A.C.Camargo Cancer Center, de janeiro 1980 a fevereiro de 2010.

#### **4.2.2 Variáveis Coletadas**

As características clínicas foram analisadas conforme protocolo abaixo:

- a) Idade da paciente;
- b) Sintoma referido pela paciente, prurido, sangramento, presença de tumor, sinais de infecção e dor;
- c) Menopausa presente ou ausente;
- d) Aspecto macroscópico do tumor ao exame físico, úlcero-infiltrativo, vegetante, leucoplasia ou eritroplasia;
- e) Tamanho do maior diâmetro do tumor ao exame físico em cm;

- f) Local principal da lesão na vulva: clitoris, fúrcula, lábio maior ou menor;
- g) Classificação do local do tumor: mediano (definido como tumor distando até 1 cm da linha média) ou lateral definido como tumor que dista mais de 1 cm da linha média);
- h) Avaliação da região inguinal no exame físico quanto à suspeita de metástase no linfonodo;
- i) Os procedimentos cirúrgicos realizados
- j) Complicações pós-operatórias principais: sangramento, deiscência de sutura, trombose venosa profunda, óbito até o trigésimo dia de pós-operatório;
- k) Estadiamento do câncer de vulva conforme o sistema da FIGO;
- l) Tratamento com quimioterapia e radioterapia;
- m) Sobrevida;
- n) Recidiva.

Os dados de patologia incluídos foram:

- a) Tamanho do tumor em milímetros pós conservação em formol;
- b) Resultado da avaliação dos linfonodos ressecados: número de linfonodos ressecados, medida macroscópica do linfonodo comprometido, medida em mm da metástase, presença ou não de metástase bilateral e presença de extensão extra-capsular;
- c) Espessura total do tumor medida em milímetros;
- d) Invasão tumoral do estroma, medida a partir da membrana basal e medida em mm do tumor primário.

Estudo de imunistoquímica com EGFR, HER2, HER3 e HER4 foi realizado nos tumores primários e nos linfonodos positivos para metástase.

Foi realizado estudo para associação dos fatores anatomopatológicos do tumor primário com a positividade dos marcadores no tumor primário e na célula metastática.

Foi analisada análise de sobrevida associada à positividade dos marcadores de imunistoquímica.

#### **4.2.3 Critérios de Inclusão**

- Confirmação de carcinoma epidermóide de vulva;
- Disponibilidade de material conservado em parafina para estudo imunistoquímico.

#### **4.2.4 Critérios de Exclusão**

Foram consideradas ineligiáveis para o estudo as pacientes que:

- a) Receberam radioterapia pré-operatória;
- b) Receberam quimioterapia pré-operatória;
- c) Desenvolveram segunda neoplasia primária cinco anos antes ou até cinco anos após o diagnóstico do câncer de vulva, excetuando-se neoplasias de pele não melanoma.

#### **4.2.5 Determinação Imunoistoquímica da Expressão dos Receptores da Família ERBB**

Os blocos de parafina com fragmentos de tumor foram encaminhados para realização de reação imunoistoquímica no Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Para análise imunoistoquímica, foi utilizado Microarranjos de Tecido (TMA).

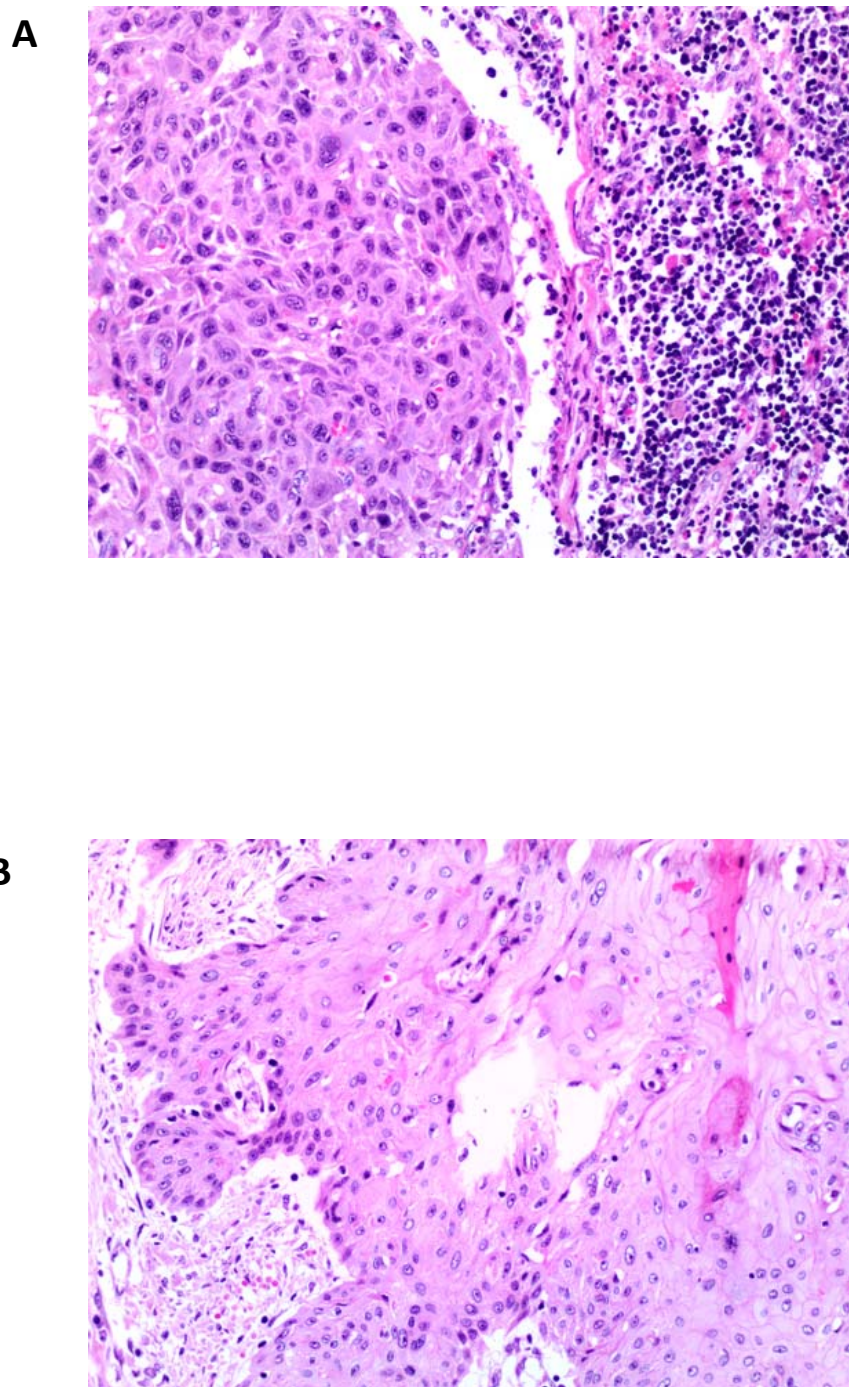
O TMA é um bloco de parafina composto de múltiplos espécimes que podem ser simultaneamente investigados com diferentes técnicas *in situ*, resultando em uma significativa redução de tempo e custo, comparado com estudos histopatológicos convencionais.

A construção do TMA iniciou-se com a seleção dos blocos doadores. Confeccionou-se uma nova lâmina de hematoxilina-eosina (HE) onde se realizou a marcação circular da região de interesse do estudo. A partir desta área pré-definida, o Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) removeu o cilindro de tecido tumoral do bloco doador, o qual foi inserido em um bloco de parafina receptor. O cilindro de tecido com uma dimensão de 1,0 mm de cada espécie foi puncionado e disposto no bloco de parafina receptor de acordo com as coordenadas cartesianas, separados por espaço de 0,2 mm. Na secção do bloco de TMA resultante foi utilizado um micrótomo manual, com posterior transferência em fita adesiva para lâminas especiais (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ). A retirada da fita para exposição à luz ultravioleta e o armazenamento das lâminas cobertas por parafina e embaladas a vácuo em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  concluíram o processo de construção do TMA.

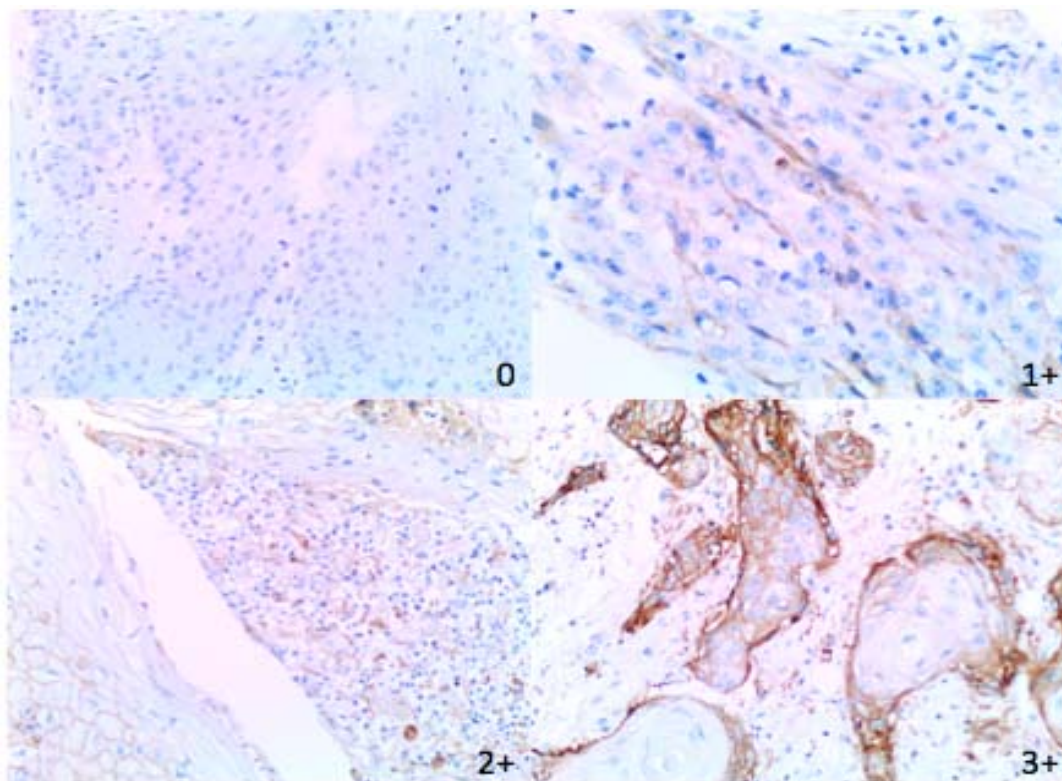
A reação imunoistoquímica foi realizada à temperatura ambiente com: Anticorpos monoclonais EGFR, HER2, HER3 e HER4.

A leitura das lâminas foram feitas em microscópio óptico comum por um mesmo patologista e revisada por outro patologista. Este não teve acesso aos dados clínicos e os resultados foram classificados em relação à intensidade da reação positiva.

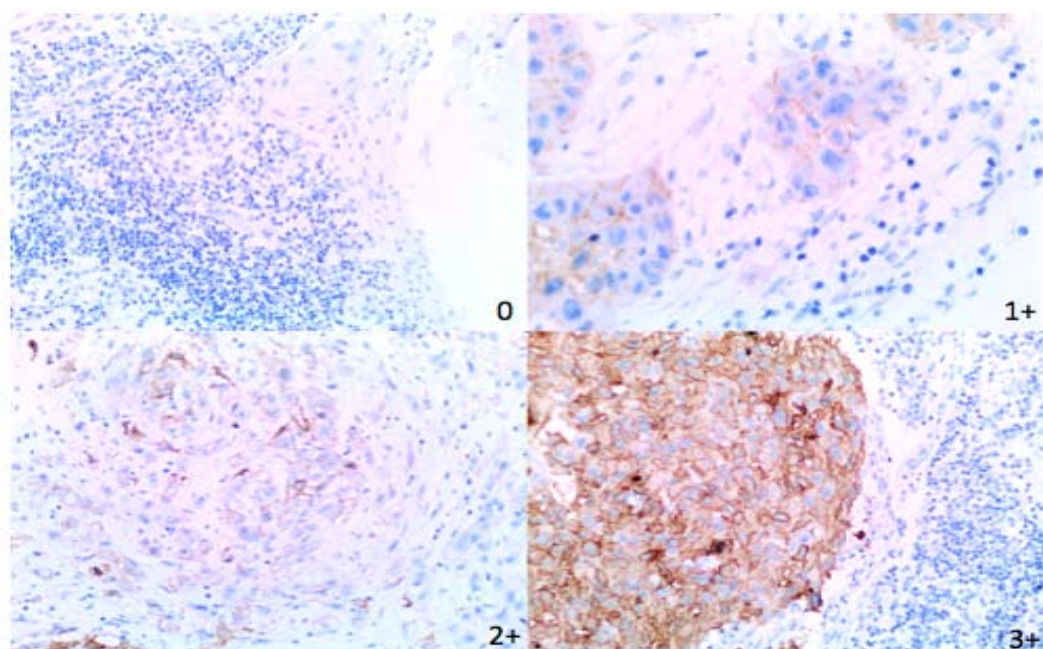
A expressão em membrana celular de cada uma das amostras imunoistoquímicas de tumor foi interpretada através de padronização semi-quantitativa segundo a técnica padronizada por WOLFF et al. (2013). Foi graduada como “negativa” quando não houve expressão imunoistoquímica ou em menos de 10% das células neoplásicas; “1+” quando houve fraca intensidade de expressão imunoistoquímica e parcial de membrana em mais de 10% das células neoplásicas; “2+” quando houve fraca ou moderada intensidade de expressão imunoistoquímica em toda membrana em mais de 10% das células neoplásicas e “3+” quando houve forte intensidade de expressão imunoistoquímica em toda membrana celular em mais de 10% das células neoplásicas. Foram categorizados como positivos os casos com resultado 1+ 2+ ou 3+. Ressaltamos que não há um “cut off” estabelecido na literatura para imunoistoquímica ser considerada negativa ou positiva.



**Figura 3** – Fotomicrografia exemplificando um carcinoma de células escamosas: A. Metástase linfonodal; B. Tumor primário da vulva grau histológico 1 (10x).

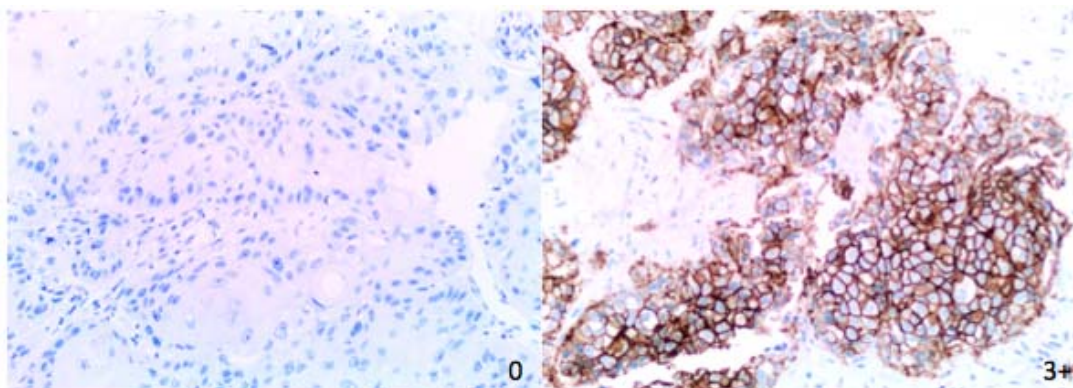


**Figura 4** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do EGFR no tumor primário da vulva (20x).

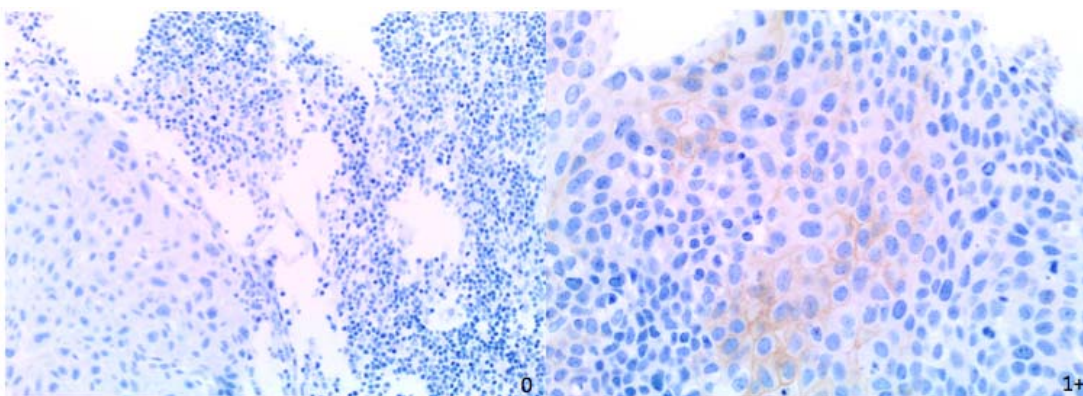


**Figura 5** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do EGFR na metástase linfonodal (20x).

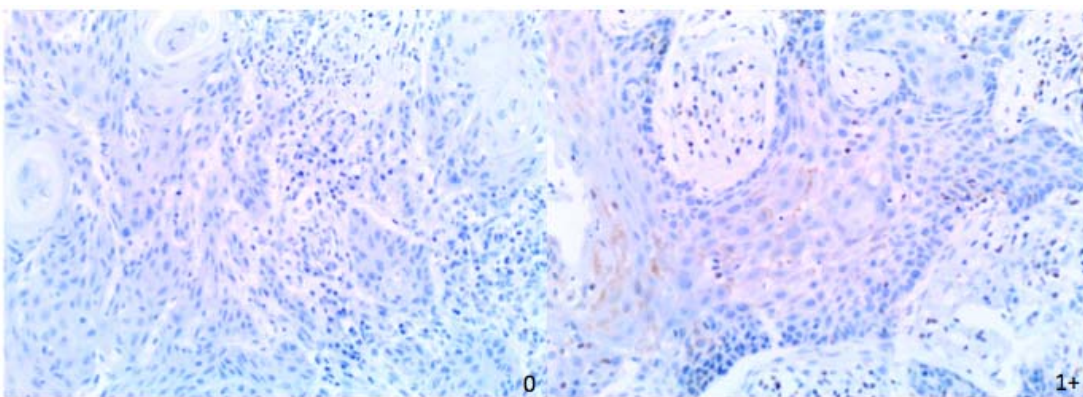




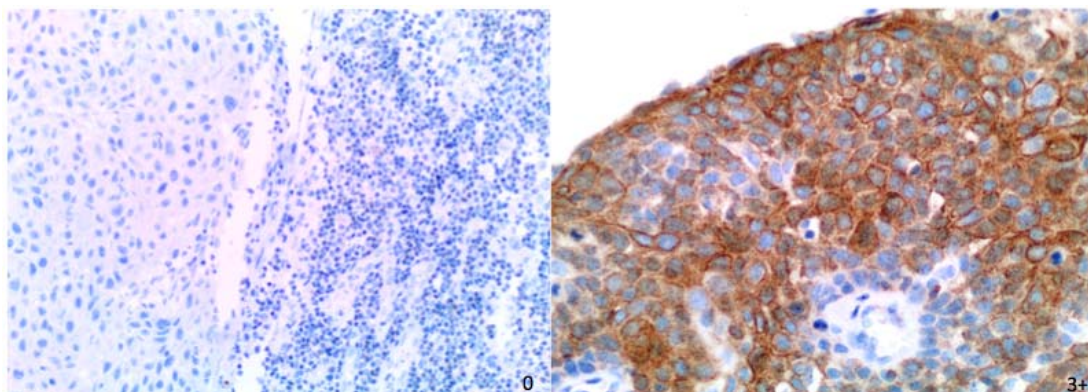
**Figura 6** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunohistoquímica do HER2 no tumor primário da vulva (20x).



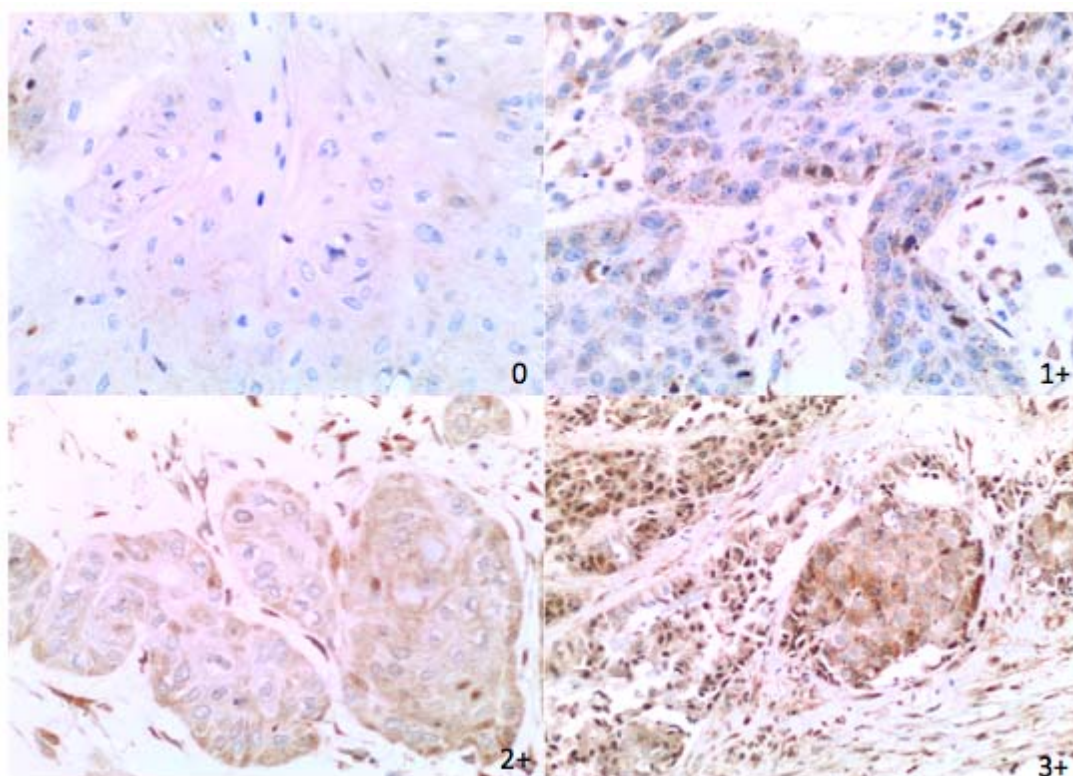
**Figura 7** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunohistoquímica do HER2 na metástase linfonodal (10x; 20x).



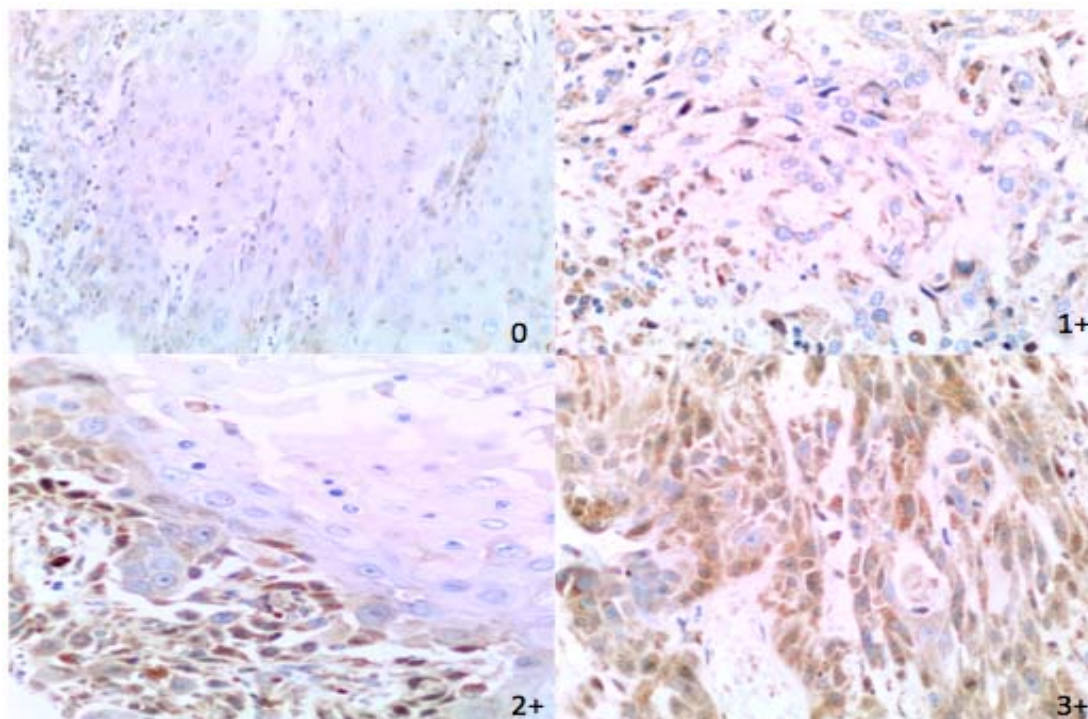
**Figura 8** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunohistoquímica do HER3 no tumor primário da vulva (20x).



**Figura 9** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER3 na metástase linfonodal (10x; 20x).



**Figura 10** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER4 no tumor primário da vulva (20x).



**Figura 11** – Fotomicrografia exemplificando a expressão imunoistoquímica do HER4 na metástase linfonodal (20x).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram realizadas no programa estatístico “Statistical Package for Social Sciences” versão 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL).

As variáveis de interesse foram as expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4. As variáveis de controle foram: idade, aspecto macroscópico do tumor, tamanho do maior diâmetro do tumor ao exame físico, localização da lesão na vulva, estadiamento, avaliação anatomopatológica dos linfonodos ressecados, avaliação anatomopatológica do tumor primário. Inicialmente foram calculadas frequências simples de todas as variáveis. As associações entre as variáveis foram analisadas pelo teste qui-quadrado bi-caudal e pelo teste de Fisher quando necessário.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan e Meier, e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste de log rank (KAPLAN e MEIER 1958).

A análise multivariada foi realizada através do modelo de regressão de Cox (COX 1972). Para todos os testes realizados, considerou-se  $p < 0,05$ .

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS**

Foram avaliadas 110 pacientes portadoras de metástase linfonodal. A idade mediana foi de 68 anos (30-91). O tempo mediano dos sintomas foi de 6,5 meses (1-120) sendo os principais sintomas: ulceração, tumoração e prurido, encontrados em 66 (60%), 45 (40,9%) e 18 (16,4%) dos casos, respectivamente.

Em relação à localização, 83 (75,5%) tinham tumores localizados um lado da vulva (unilaterais) e 27 (24,5%) apresentaram acometimento bilateral. O clitóris foi encontrado envolvido em 27 (24,5%) dos casos.

Oitenta (72,7%) pacientes apresentavam linfonodos clinicamente suspeitos em região inguinal, sendo 45 (40,9%) unilaterais e 35 (31,8%) bilaterais. Dezesete (15,5%) casos apresentaram linfonodos fixos ou com ulceração para pele.

Em relação à cirurgia do tumor primário 102 (92,7%) foram submetidas a vulvectomy radical e 8 (7,3%) a ressecção local ampliada. Vinte e quatro (21,8%) pacientes foram submetidas a reconstrução com retalhos miocutâneos (gracil 20; reto abdominal 2; fascia lata 1; gluteo 1).

Oitenta e três (75,4%) pacientes foram submetidas a linfadenectomia inguinal bilateral e 27 (24,6%) a linfadenectomia inguinal unilateral. Dezoito (16,4%) casos foram também submetidos a linfadenectomia pélvica. A mediana de linfonodos ressecados foi de 19 (1-57).

Foram encontradas complicações de ferida operatória em 78 (70,9%) casos, sendo infecção de ferida operatória em 21 (19,1%) e algum grau de deiscência em 51 (46,4%) dos casos.

## **6.2 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS**

O tamanho mediano do tumor foi de 4,7 cm (1-18cm). Foi possível avaliar o tamanho da metástase linfonodal em 49 casos, sendo o tamanho mediano de 11mm (1-26mm). Em relação à profundidade de invasão, a mediana foi de 10mm (3-20mm). A presença de invasão angiolinfática foi observada em 29 casos, sendo que estava presente em 14 (48,3%) casos. Presença de invasão perineural foi encontrada em 9 casos (37,5%), dos 24 casos analisados. Em relação ao grau histológico, foram considerados Grau 1, Grau 2 e Grau 3, respectivamente 42 (68,9%) 15 (24,6%) e 4 (6,6%) casos. Em relação às margens cirúrgicas, foi encontrada margem <8mm em 29 (42%) casos e  $\geq$ 8mm em 40 (58%) casos.

Foi encontrada transposição capsular em 16 (14,5%) casos. Em relação à lateralidade dos linfonodos inguinais comprometidos, foram unilaterais em 76 (69,1%) dos casos e bilaterais em 34 (30,9%). A mediana de linfonodos comprometidos foi de 2 (1-16), sendo que apresentaram o número de linfonodos comprometidos de 1, 2 e  $\geq$ 3, respectivamente 34 (30,9%), 30 (27,3%) e 46 (41,8%) casos.

### 6.3 EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS DO EGFR, HER2, HER3 E HER4

As expressões imunoistoquímicas dos marcadores estudados nos tumores primários foram encontradas em membrana citoplasmática. Houve expressão de EGFR, HER2, HER3 e HER4 nos tumores primários em 28,8%, 2,8%, 3% e 76,8% dos casos, respectivamente. A Tabela 1 resume a expressão dos marcadores.

Em relação às expressões imunoistoquímicas de EGFR e HER4 nos linfonodos inguinais metastáticos, foi positiva em 48,1% e 69,6% dos casos, respectivamente. Não houve expressão imunoistoquímica de HER2 e HER3 nos linfonodos inguinais metastáticos. A Tabela 2 resume a expressão dos marcadores.

**Tabela 1** - Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4 no câncer de vulva.

| Variável | Categoria | n  | (%)    |
|----------|-----------|----|--------|
| EGFR     | Negativa  | 52 | (71,2) |
|          | Positiva  | 21 | (28,8) |
|          | NA        | 37 | (33,6) |
| HER2     | Negativa  | 70 | (97,2) |
|          | Positiva  | 2  | (2,8)  |
|          | NA        | 38 | (34,5) |
| HER3     | Negativa  | 64 | (97)   |
|          | Positiva  | 2  | (3)    |
|          | NA        | 44 | (40)   |
| HER4     | Negativa  | 16 | (23,2) |
|          | Positiva  | 53 | (76,8) |
|          | NA        | 41 | (37,3) |

NA: Não avaliável devido a ausência de tumor na core do TMA

**Tabela 2** - Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4 na metástase linfonodal do câncer de vulva.

| Variável | Categoria | n  | (%)    |
|----------|-----------|----|--------|
| EGFR     | Negativa  | 14 | (51,9) |
|          | Positiva  | 13 | (48,1) |
|          | NA        | 27 | (24,5) |
| HER2     | Negativa  | 30 | (100)  |
|          | Positiva  | 0  | (0)    |
|          | NA        | 80 | (72,7) |
| HER3     | Negativa  | 24 | (100)  |
|          | Positiva  | 0  | (0)    |
|          | NA        | 86 | (78,2) |
| HER4     | Negativa  | 7  | (30,4) |
|          | Positiva  | 16 | (69,6) |
|          | NA        | 87 | (79,1) |

NA: Não avaliável devido a ausência de tumor na core do TMA

Não foram encontradas relações entre as expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4 entre o tumores primários e as metástases linfonodais Tabelas 3-6).

**Tabela 3** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário e na metástase linfonodal.

|                |           | Metástase linfonodal |          |     |
|----------------|-----------|----------------------|----------|-----|
| Variável       | Categoria | Negativa             | Positiva | p   |
| Tumor primário | Negativa  | 9                    | 6 (40%)  | 0,6 |
|                | Positiva  | 2                    | 3 (60%)  |     |

**Tabela 4** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário e na metástase linfonodal.

|                |           | Metástase linfonodal |          |   |
|----------------|-----------|----------------------|----------|---|
| Variável       | Categoria | Negativa             | Positiva | p |
| Tumor primário | Negativa  | 23                   | 0        | - |
|                | Positiva  | 1                    | 0        | - |



**Tabela 5** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário e na metástase linfonodal.

| Variável       | Categoria | Metástase linfonodal |          | p |
|----------------|-----------|----------------------|----------|---|
|                |           | Negativa             | Positiva |   |
| Tumor primário | Negativa  | 14                   | 0        | - |
|                | Positiva  | 1                    | 0        | - |

**Tabela 6** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário e na metástase linfonodal.

| Variável       | Categoria | Metástase linfonodal |           | p   |
|----------------|-----------|----------------------|-----------|-----|
|                |           | Negativa             | Positiva  |     |
| Tumor primário | Negativa  | 4                    | 5 (55,6%) | 0,6 |
|                | Positiva  | 2                    | 5 (71,4%) | -   |

#### 6.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS DO EGFR, HER-2, HER-3 E HER-4 E AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

A expressão imunoistoquímica de HER4 foi mais frequente em tumores <4cm (95%) quando comparados a tumores  $\geq$ 4cm (69,6%). Não houve relação estatisticamente significativa entre as expressões de EGFR, HER2 e HER3 e as variáveis anatomopatológicas (Tabelas 7-12)

**Tabela 7 - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas.**

| Variável                     | Categoria   | Expressão de EGFR |            | p    |
|------------------------------|-------------|-------------------|------------|------|
|                              |             | Negativa          | Positiva   |      |
| Tamanho tumor                | <4cm        | 15                | 6 (28%)    | 0,89 |
|                              | ≥4cm        | 35                | 13 (27,1%) |      |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm       | 12                | 5 (29,4%)  | 1,0  |
|                              | >10mm       | 15                | 6 (28,6%)  |      |
| Número linfonodos positivos  | 1           | 12                | 6 (33,3%)  | 0,41 |
|                              | ≥2          | 39                | 15 (27,8%) |      |
| Invasão estromal             | <10mm       | 12                | 2 (14,3%)  | 0,41 |
|                              | ≥10mm       | 12                | 6 (33,3%)  |      |
| Invasão angiolinfática       | Ausente     | 8                 | 1 (11,1%)  | 1,0  |
|                              | Presente    | 8                 | 2 (20%)    |      |
| Invasão perineural           | Ausente     | 9                 | 2 (18,2%)  | 1,0  |
|                              | Presente    | 4                 | 1 (20%)    |      |
| Grau histológico             | Grau 1      | 24                | 5 (17,2%)  | 0,12 |
|                              | Graus 2 e 3 | 7                 | 6 (28%)    |      |

**Tabela 8 - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do EGFR na metástase linfonodal com as variáveis anatomopatológicas.**

| Variável                     | Categoria   | Expressão de EGFR |           | p    |
|------------------------------|-------------|-------------------|-----------|------|
|                              |             | Negativa          | Positiva  |      |
| Tamanho tumor                | <4cm        | 5                 | 5 (50%)   | 1,0  |
|                              | ≥4cm        | 8                 | 7 (46,7%) |      |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm       | 7                 | 3 (30%)   | 0,24 |
|                              | >10mm       | 6                 | 8 (57,1%) |      |
| Invasão estromal             | <10mm       | 6                 | 3 (33,3%) | 0,62 |
|                              | ≥10mm       | 3                 | 3 (50%)   |      |
| Invasão angiolinfática       | Ausente     | 2                 | 2 (50%)   | 0,42 |
|                              | Presente    | 3                 | 0 (0%)    |      |
| Invasão perineural           | Ausente     | 4                 | 1 (20%)   | 0,33 |
|                              | Presente    | 0                 | 1 (100%)  |      |
| Grau histológico             | Grau 1      | 7                 | 4 (36,4%) | 1,0  |
|                              | Graus 2 e 3 | 2                 | 2 (50%)   |      |

**Tabela 9** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas.

| Variável                     | Categoria   | Expressão de EGFR |           | p            |
|------------------------------|-------------|-------------------|-----------|--------------|
|                              |             | Negativa          | Positiva  |              |
| Tamanho tumor                | <4cm        | 20                | 1 (4,8%)  | 0,52         |
|                              | ≥4cm        | 46                | 1 (2,1%)  |              |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm       | 18                | 0 (0%)    | 1,0          |
|                              | >10mm       | 19                | 1 (5%)    |              |
| Número linfonodos positivos  | 1           | 15                | 2 (11,8%) | <b>0,055</b> |
|                              | ≥2          | 54                | 0 (0%)    |              |
| Invasão estromal             | <10mm       | 13                | 1 (7,1%)  | 0,45         |
|                              | ≥10mm       | 17                | 0 (0%)    |              |
| Invasão angiolinfática       | Ausente     | 8                 | 1 (11,1%) | 1,0          |
|                              | Presente    | 9                 | 0 (0%)    |              |
| Invasão perineural           | Ausente     | 10                | 1 (9,1%)  | 1,0          |
|                              | Presente    | 4                 | 0 (0%)    |              |
| Grau histológico             | Grau 1      | 29                | 0 (0%)    | 0,129        |
|                              | Graus 2 e 3 | 11                | 1 (8,3%)  |              |

**Tabela 10** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas.

| Variável                     | Categoria   | Expressão de EGFR |           | p          |
|------------------------------|-------------|-------------------|-----------|------------|
|                              |             | Negativa          | Positiva  |            |
| Tamanho tumor                | <4cm        | 19                | 1 (5%)    | 0,53       |
|                              | ≥4cm        | 42                | 1 (2,3%)  |            |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm       | 15                | 0 (0%)    | 1,0        |
|                              | >10mm       | 16                | 1 (5,9%)  |            |
| Número linfonodos positivos  | 1           | 13                | 2 (13,3%) | <b>0,5</b> |
|                              | ≥2          | 50                | 0 (0%)    |            |
| Invasão estromal             | <10mm       | 11                | 2 (15,4%) | 0,19       |
|                              | ≥10mm       | 16                | 0 (0%)    |            |
| Invasão angiolinfática       | Ausente     | 6                 | 2 (25%)   | 0,18       |
|                              | Presente    | 10                | 0 (0%)    |            |
| Invasão perineural           | Ausente     | 8                 | 2 (9,1%)  | 0,52       |
|                              | Presente    | 5                 | 0 (0%)    |            |
| Grau histológico             | Grau 1      | 25                | 1 (0%)    | 1,0        |
|                              | Graus 2 e 3 | 11                | 0 (8,3%)  |            |

**Tabela 11** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário com as variáveis anatomopatológicas.

| Variável                     | Categoria | Expressão de EGFR |            | p            |
|------------------------------|-----------|-------------------|------------|--------------|
|                              |           | Negativa          | Positiva   |              |
| Tamanho tumor                | <4cm      | 1                 | 19 (95%)   | <b>0,027</b> |
|                              | ≥4cm      | 14                | 32 (69,6%) |              |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm     | 4                 | 12 (75%)   | 0,72         |
|                              | >10mm     | 6                 | 13 (68,4%) |              |
| Número linfonodos positivos  | 1         | 4                 | 12 (75%)   | 1,0          |
|                              | ≥2        | 12                | 40 (76,9%) |              |
| Invasão estromal             | <10mm     | 2                 | 12 (85,7%) | 1,0          |
|                              | ≥10mm     | 3                 | 14 (82,4%) |              |
| Invasão angiolinfática       | Ausente   | 2                 | 7 (77,8%)  | 1,0          |
|                              | Presente  | 3                 | 7 (70%)    |              |
| Invasão perineural           | Ausente   | 2                 | 9 (81,8%)  | 0,54         |
|                              | Presente  | 2                 | 3 (60%)    |              |
| Grau histológico             | Grau 1    | 6                 | 22 (78,6%) | 1,0          |
|                              |           | 2                 | 9 (81,8%)  |              |

**Tabela 12** - Correlação entre as expressões imunoistoquímicas do HER4 na metástase linfonodal com as variáveis anatomopatológicas.

| Variável                     | Categoria   | Expressão de EGFR |            | p    |
|------------------------------|-------------|-------------------|------------|------|
|                              |             | Negativa          | Positiva   |      |
| Tamanho tumor                | <4cm        | 2                 | 6 (75%)    | 1,0  |
|                              | ≥4cm        | 4                 | 9 (69,2%)  |      |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm       | 3                 | 4 (57,1%)  | 0,63 |
|                              | >10mm       | 4                 | 10 (71,4%) |      |
| Invasão estromal             | <10mm       | 2                 | 6 (75%)    | 1,0  |
|                              | ≥10mm       | 1                 | 5 (83,3%)  |      |
| Invasão angiolinfática       | Ausente     | 2                 | 2 (77,8%)  | 0,46 |
|                              | Presente    | 0                 | 2 (70%)    |      |
| Invasão perineural           | Ausente     | 2                 | 2 (50%)    | 1,0  |
|                              | Presente    | 0                 | 1 (100%)   |      |
| Grau histológico             | Grau 1      | 1                 | 7 (87,5%)  | 0,49 |
|                              | Graus 2 e 3 | 1                 | 2 (66,7%)  |      |

## **6.5 DADOS DO SEGUIMENTO**

O seguimento mediano foi de 17 meses, variando de 1 a 321 meses. Ao término do seguimento, 32 (29,1%) pacientes encontravam-se vivas e sem câncer, 4 (3,6%) vivas com câncer, 55 (50%) mortes por câncer e 19 (17,3%) mortes por outras causas. Houve 62 (56,4%) recidivas, sendo locais 23 (37,1%), linfonodais 19 (30,6%), à distância 9 (14,5%) e locorregional associado à distância em 11 (17,7%) casos.

## **6.6 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA**

A sobrevida livre de doença mediana foi de 25 meses (15-34), sendo 34,4% em 5 anos.

As expressões de EGFR, HER2, HER3 e HER4 não apresentaram impacto em sobrevida livre de doença. As variáveis que tiveram impacto negativo na sobrevida livre de doença em análise univariada foram: linfadenectomia unilateral, presença de invasão perineural e presença de extravazamento capsular (Tabelas 13-15 e Figuras 12-17).

**Tabela 13** – Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das variáveis clinicopatológicas e expressões imunoistoquímicas nos tumores primários.

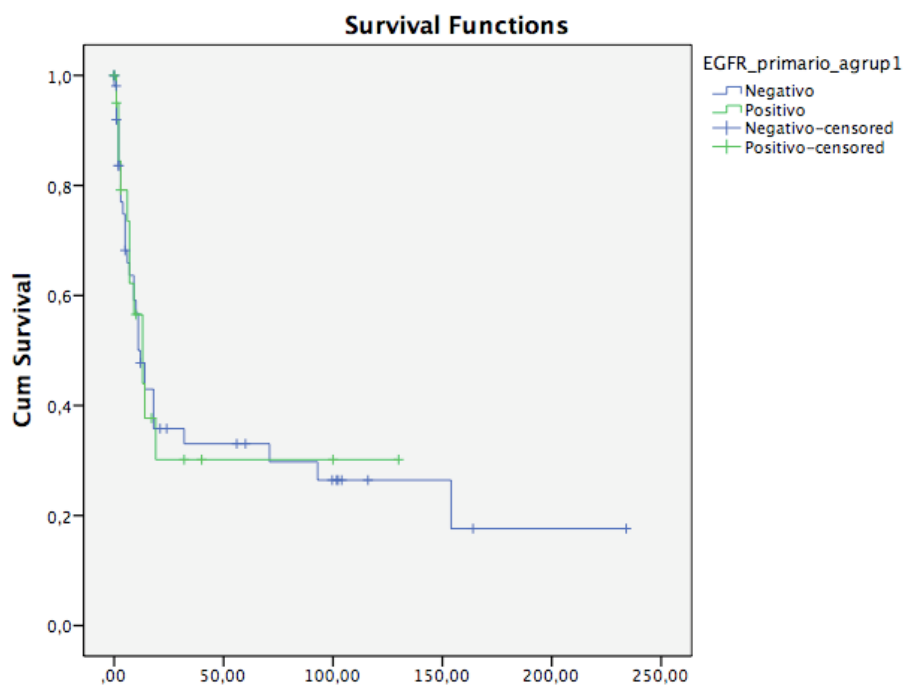
| Variável                     | Categoria  | SLD (%) em 5 anos | p            |
|------------------------------|------------|-------------------|--------------|
| Idade                        | <70 anos   | 43,5%             | 0,083        |
|                              | ≥70 anos   | 24,3%             |              |
| Tipo linfadenectomia         | Unilateral | 30,4%             | <b>0,004</b> |
|                              | Bilateral  | 12,6%             |              |
| Tamanho do tumor             | <4cm       | 44,6%             | 0,14         |
|                              | ≥4cm       | 31,2%             |              |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm      | 37,9%             | 0,54         |
|                              | >10mm      | 33,6%             |              |
| Invasão estromal             | <10mm      | 63,2%             | 0,10         |
|                              | ≥10mm      | 36,3%             |              |
| Invasão angiolinfática       | Ausente    | 46,8%             | 0,09         |
|                              | Presente   | 15,6%             |              |
| Invasão perineural           | Ausente    | 55,4%             | <b>0,009</b> |
|                              | Presente   | 0%                |              |
| Grau histológico             | Grau 1     | 33,9%             | 0,35         |
|                              | Graus 2 e  | 36,9              |              |
| Extravazamento capsular      | Ausente    | 39,6%             | 0,008        |
|                              | Presente   | 15,6%             |              |
| Número linfonodos positivos  | 1          | 41,6%             | 0,31         |
|                              | ≥2         | 33,7%             |              |
| Lateralidade linfonodos      | Unilateral | 37,3%             | 0,50         |
|                              | Bilateral  | 30,5%             |              |
| Distância da margem livre    | <8mm       | 20,1%             | 1,10         |
|                              | <8mm       | 44,1%             |              |

**Tabela 14** – Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função da expressões imunoistoquímicas nos tumores primários.

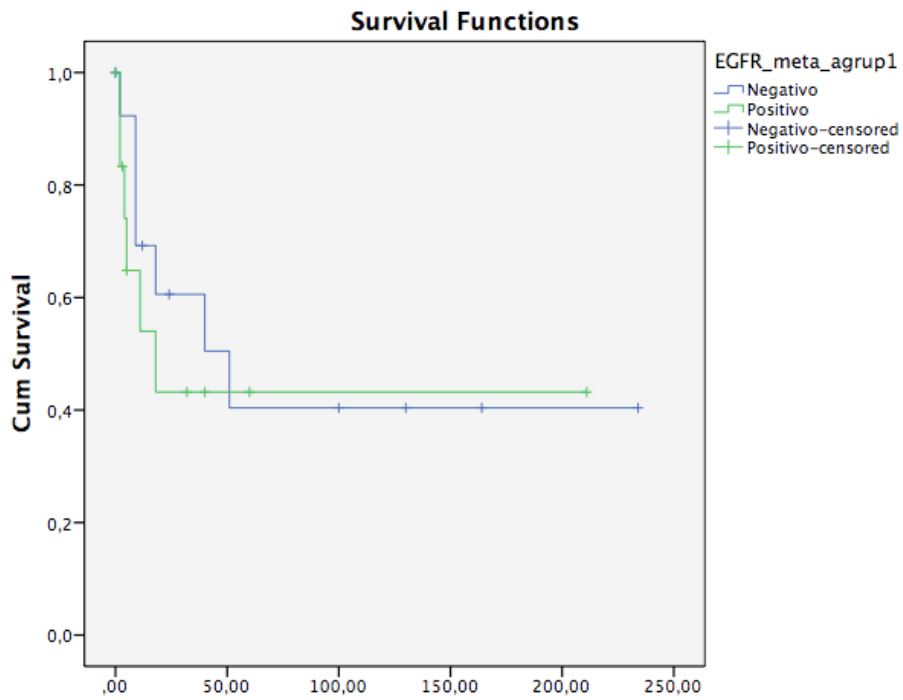
| Variável          | Categoria | SLD (%) em 5 anos | p    |
|-------------------|-----------|-------------------|------|
| Expressão do EGFR | Negativa  | 33,4%             | 0,94 |
|                   | Positiva  | 30,2%             |      |
| Expressão do HER2 | Negativa  | 32,8%             | 0,94 |
|                   | Positiva  | 0%                |      |
| Expressão do HER3 | Negativa  | 31,2%             | 0,33 |
|                   | Positiva  | 100%              |      |
| Expressão do HER4 | Negativa  | 35,7%             | 0,12 |
|                   | Positiva  | 31,8%             |      |

**Tabela 15** – Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função da expressões imunohistoquímicas da metástases linfonodais.

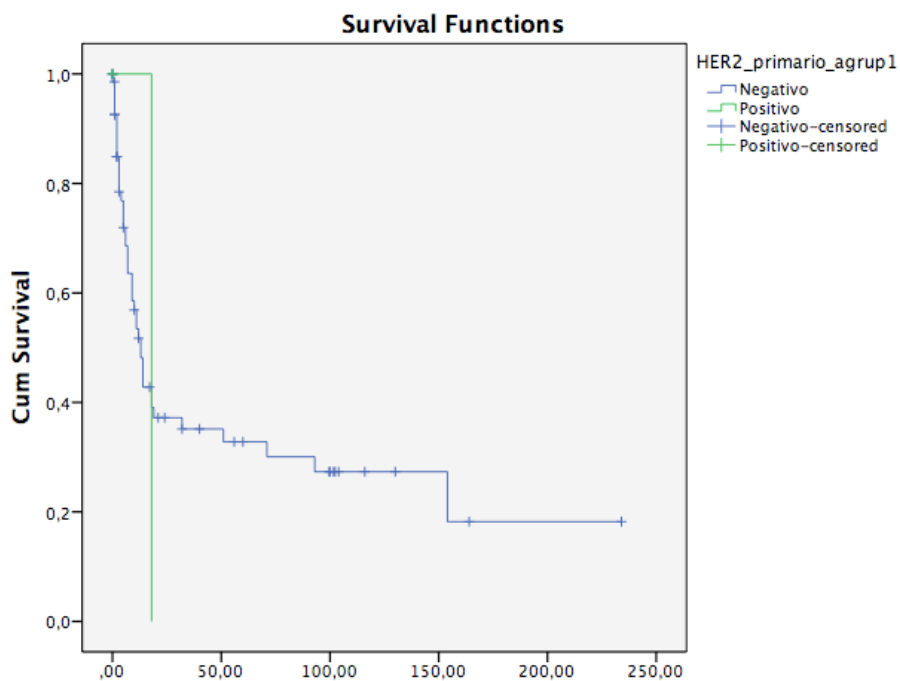
| Variável          | Categoria | SLD (%) em 5 anos | p    |
|-------------------|-----------|-------------------|------|
| Expressão do EGFR | Negativa  | 40,4%             | 0,57 |
|                   | Positiva  | 43,2%             |      |
| Expressão do HER4 | Negativa  | 66,7%             | 0,23 |
|                   | Positiva  | 30,7%             |      |



**Figura 12** – Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunohistoquímicas do EGFR no tumor primário. p: 0,94

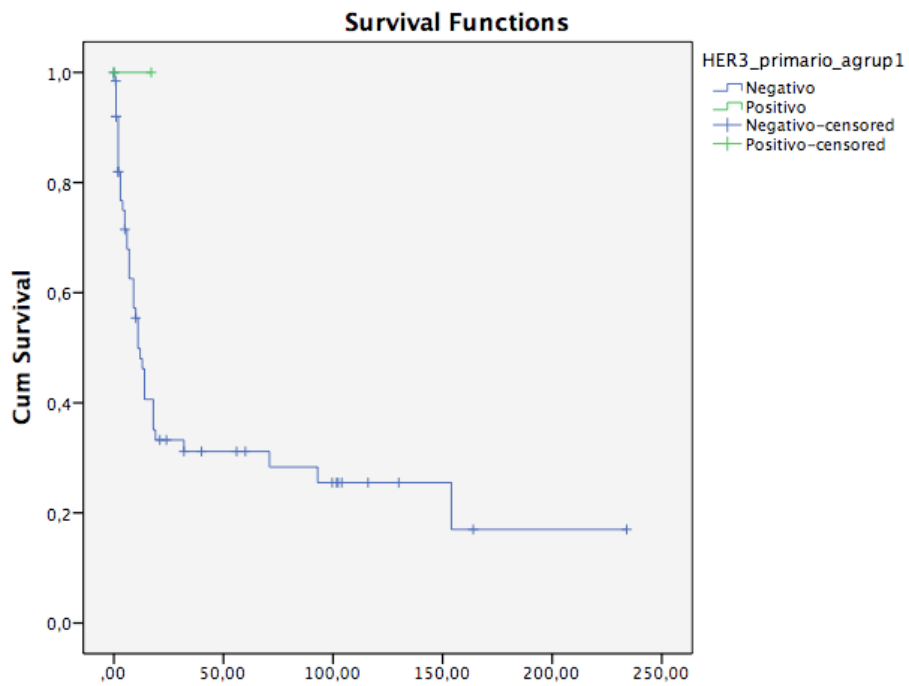


**Figura 13** – Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR na metástase linfonodal. p: 0,57

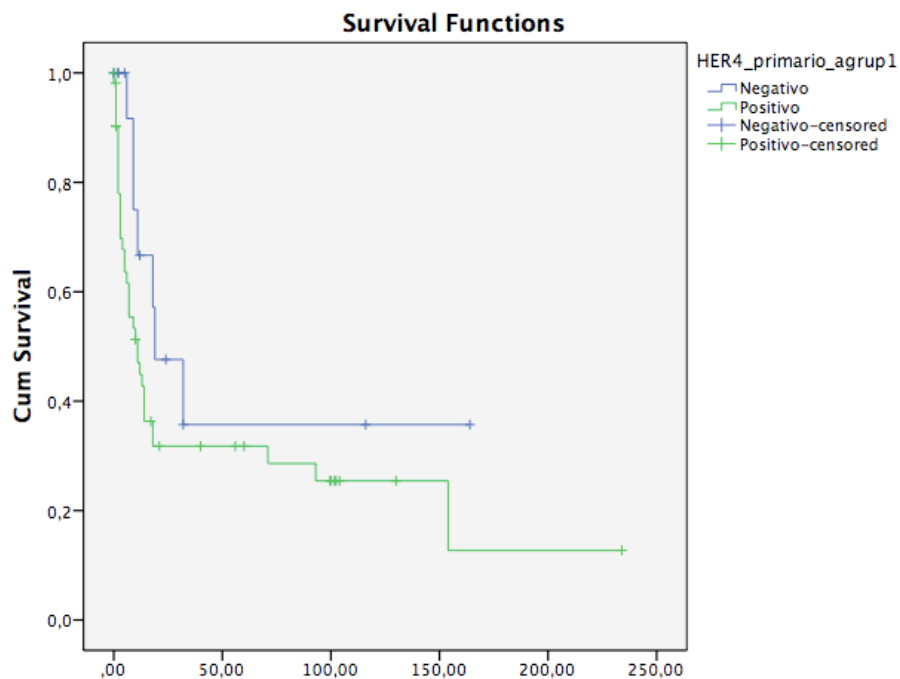


**Figura 14** - Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário. p:0,94

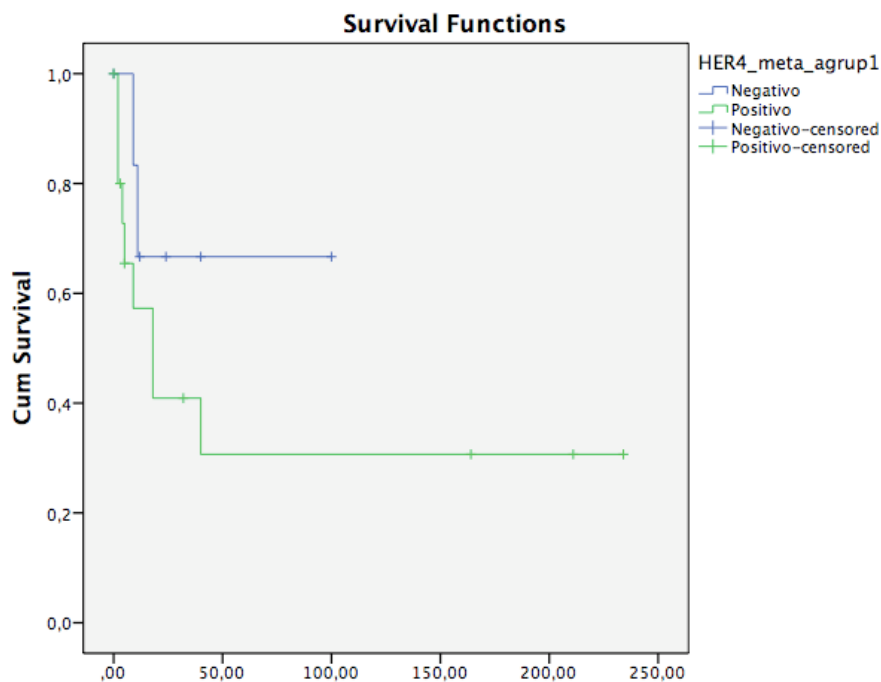




**Figura 15** - Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunohistoquímicas do HER3 no tumor primário.  $p: 0,33$



**Figura 16** – Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunohistoquímicas do HER4 no tumor primário.  $p: 0,12$



**Figura 17** – Curvas de sobrevida livre de doença em relação às expressões imunohistoquímicas do HER4 na metástase linfonodal. p: 0,23

## 6.7 SOBREVIDA GLOBAL

A sobrevida global mediana foi de 33 meses, sendo de 45,3% em 5 anos.

As expressões de EGFR, HER2, HER3 e HER4 não apresentaram impacto em sobrevida global. As variáveis que tiveram impacto negativo na sobrevida global em análise univariada foram: invasão estromal  $\geq 10\text{mm}$  e presença de extravazamento capsular (Tabelas 16-18 e Figuras 18-23).

**Tabela 16** - Taxas de sobrevida global (SG) em função das variáveis clinicopatológicas.

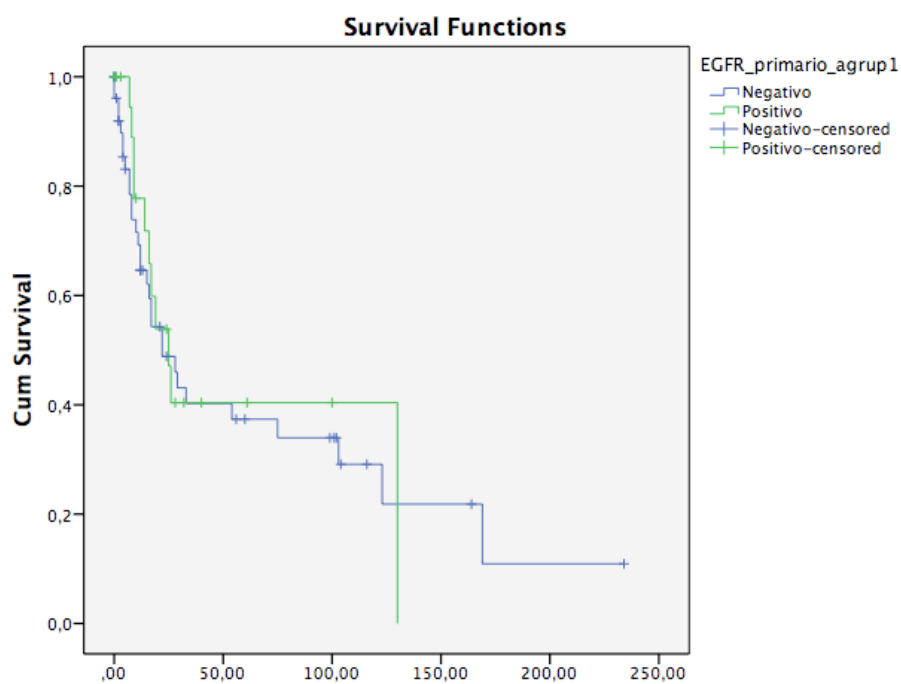
| <b>Variável</b>              | <b>Categoria</b> | <b>SLD (%) em 5 anos</b> | <b>p</b> |
|------------------------------|------------------|--------------------------|----------|
| Idade                        | <70 anos         | 38%                      | 0,12     |
|                              | ≥70 anos         | 30,1%                    |          |
| Tipo linfadenectomia         | Unilateral       | 30,4%                    | 0,08     |
|                              | Bilateral        | 49%                      |          |
| Tamanho do tumor             | <4cm             | 53%                      | 0,31     |
|                              | ≥4cm             | 42%                      |          |
| Tamanho metástase linfonodal | ≤10mm            | 67,7%                    | 0,31     |
|                              | >10mm            | 37,5%                    |          |
| Invasão estromal             | <10mm            | 77%                      | 0,018    |
|                              | ≥10mm            | 42,1%                    |          |
| Invasão angiolinfática       | Ausente          | 56,6%                    | 0,38     |
|                              | Presente         | 34,2%                    |          |
| Invasão perineural           | Ausente          | 58%                      | 0,11     |
|                              | Presente         | 22,2%                    |          |
| Grau histológico             | Grau 1           | 44,5%                    | 0,88     |
|                              | Graus 2 e 3      | 39,6%                    |          |
| Extravazamento capsular      | Ausente          | 39,6%                    | 0,08     |
|                              | Presente         | 15,6%                    |          |
| Extravazamento capsular      | Ausente          | 37,9%                    | 0,05     |
|                              | Presente         | 9,7%                     |          |
| Número linfonodos positivos  | 1                | 42,2%                    | 0,08     |
|                              | ≥2               | 31,7%                    |          |
| Distância da margem livre    | <8mm             | 34%                      | 0,2      |
|                              | ≥8mm             | 49%                      |          |

**Tabela 17** - Taxas de sobrevida global (SG) em função da expressões imunoistoquímicas nos tumores primários.

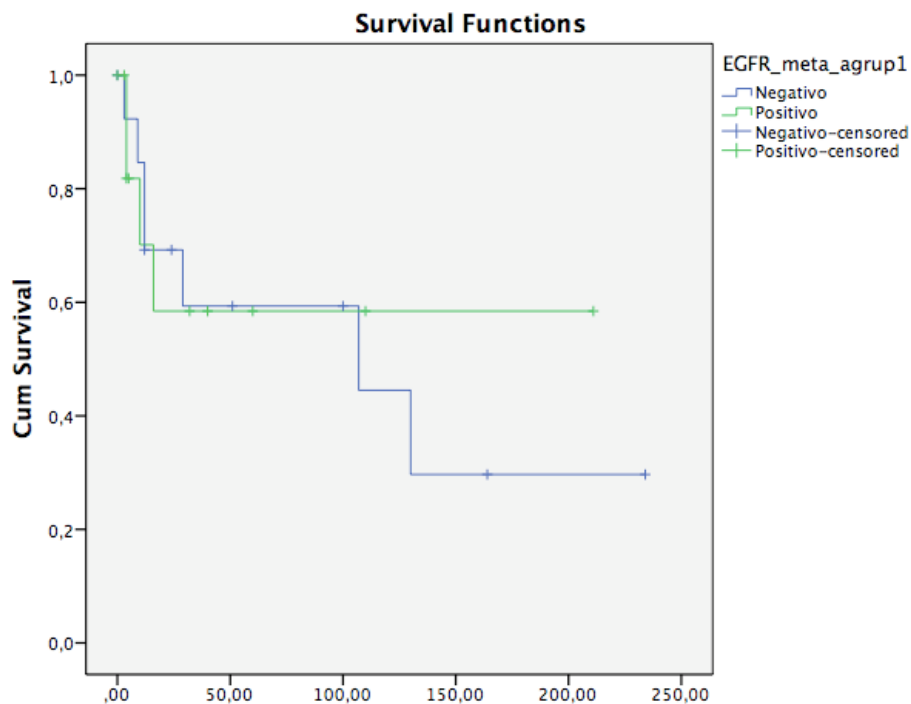
| <b>Variável</b>   | <b>Categoria</b> | <b>SLD (%) em 5 anos</b> | <b>p</b> |
|-------------------|------------------|--------------------------|----------|
| Expressão do EGFR | Negativa         | 37,4%                    | 0,79     |
|                   | Positiva         | 40,4%                    |          |
| Expressão do HER2 | Negativa         | 40,8%                    | 0,79     |
|                   | Positiva         | 0%                       |          |
| Expressão do HER3 | Negativa         | 37%                      | 0,35     |
|                   | Positiva         | 100%                     |          |
| Expressão do HER4 | Negativa         | 37,2%                    | 0,39     |
|                   | Positiva         | 38,8%                    |          |

**Tabela 18** – Taxas de sobrevida global (SG) em função das expressões imunoistoquímicas das metástases linfonodais.

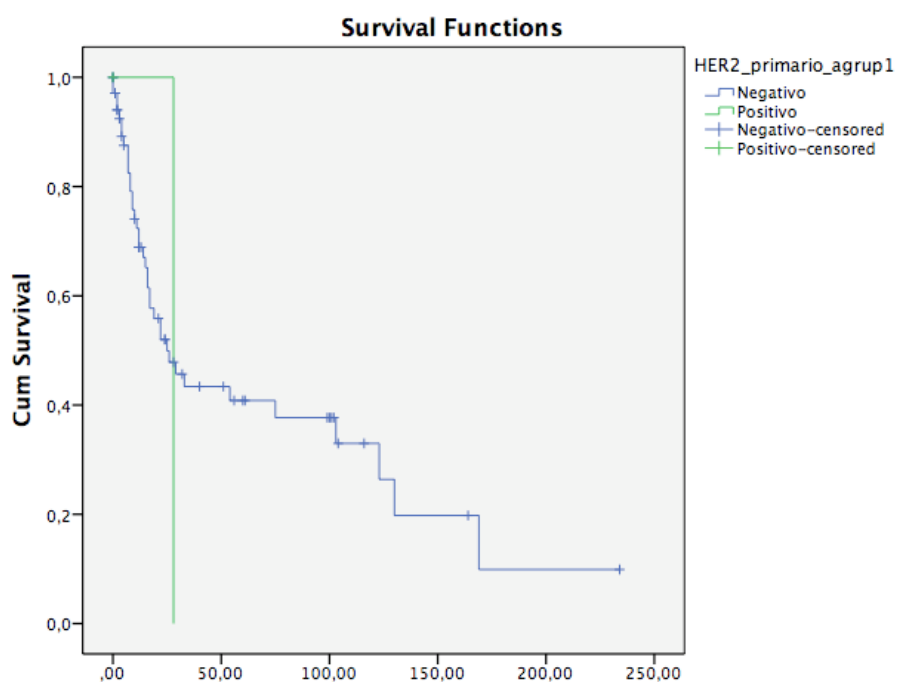
| Variável          | Categoria | SLD (%) em 5 anos | p    |
|-------------------|-----------|-------------------|------|
| Expressão do EGFR | Negativa  | 59,3%             | 0,83 |
|                   | Positiva  | 58,4%             |      |
| Expressão do HER4 | Negativa  | 62,5%             | 0,56 |
|                   | Positiva  | 52,6%             |      |



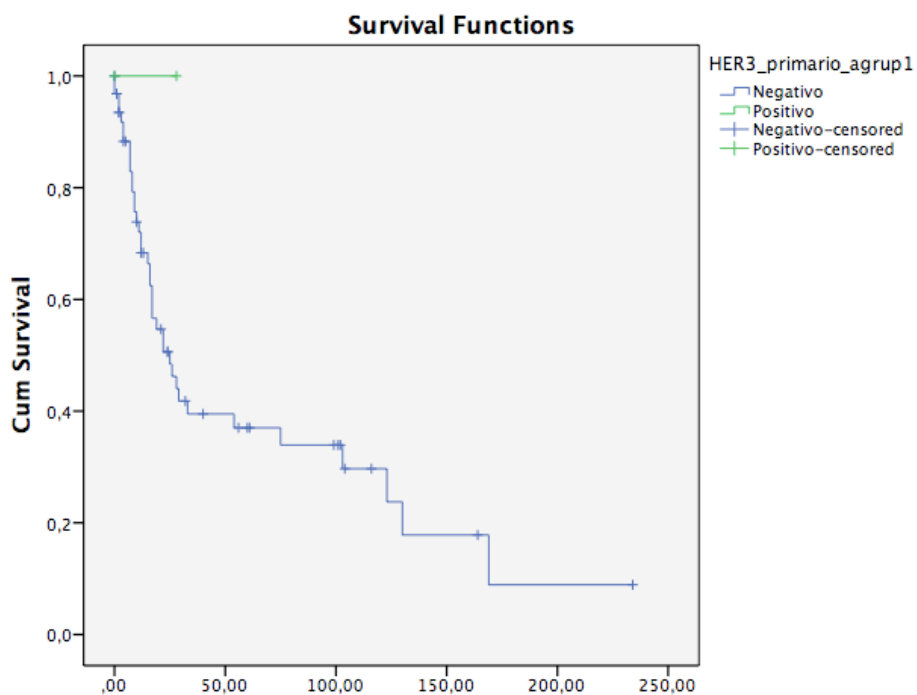
**Figura 18** – Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR no tumor primário. p:0,79



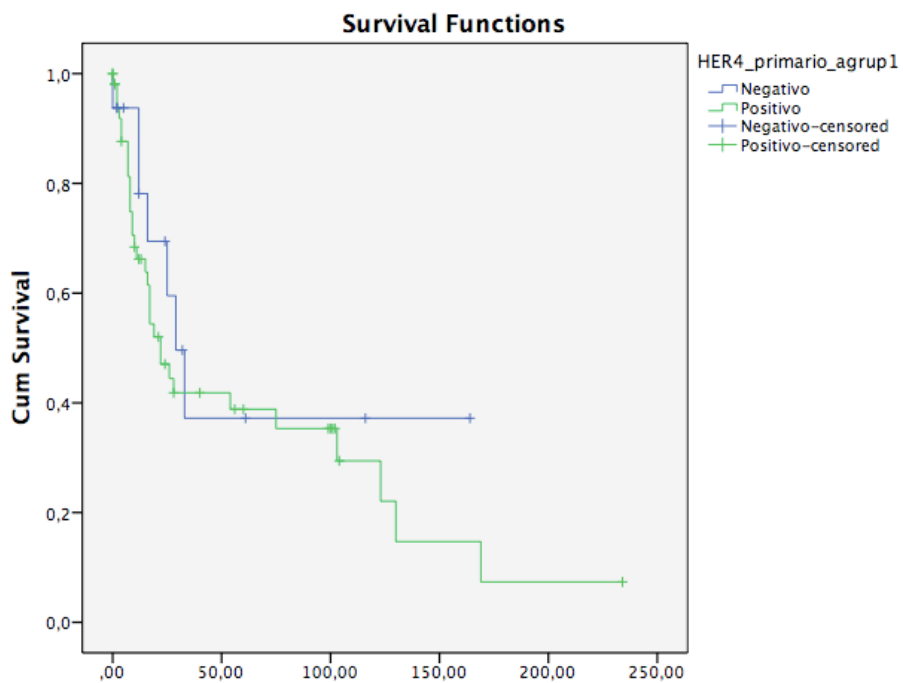
**Figura 19** – Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do EGFR na metástase linfonodal. p: 0,83



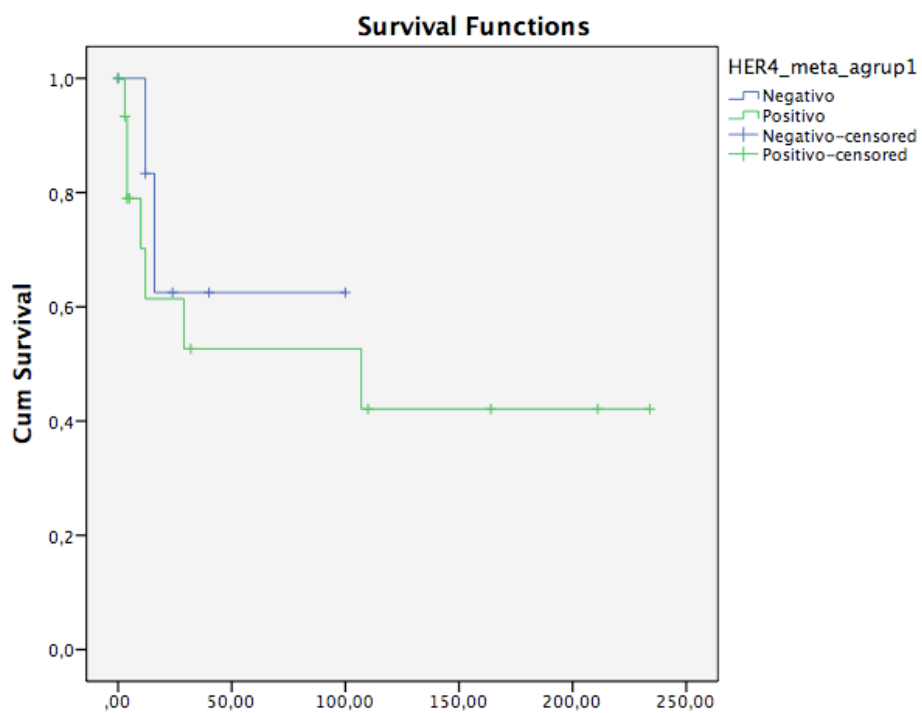
**Figura 20** – Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER2 no tumor primário. p: 0,79



**Figura 21** – Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER3 no tumor primário. p: 0,35



**Figura 22** – Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER4 no tumor primário. p:0,39



**Figura 23** – Curvas de sobrevida global em relação às expressões imunoistoquímicas do HER4 na metástase linfonodal. p:0,56

## 7 DISCUSSÃO

Desde a década de 80, foram intensificados os estudos relacionados ao tratamento do câncer de vulva (HACHER 1999). Os mais significantes avanços incluíram: individualização do tratamento para doenças invasivas (IVERSEN et al. 1981; HACKER et al. 1984), a introdução de tratamento multidisciplinar (HACHER 1999), tratamento conservador da vulva em pacientes com tumor unifocal (IVERSEN et al. 1981; BURRELL et al. 1988), omissão de grandes dissecções em pacientes com tumores T1 e não mais que 1 mm de invasão estromal (IVERSEN et al. 1981; HACKER et al. 1984), eliminação da rotina de linfadenectomia pélvica (CURRY et al. 1980; HOMESLEY et al. 1986), o uso de incisões separadas para a dissecção linfonodal (HACHER et al. 1981), omissão da dissecção linfonodal contralateral em pacientes com tumores T1 de localização lateral e linfonodo ipsilateral negativo (FIGGE e GAUDENZ 1974; IVERSEN et al. 1981; HACHER et al. 1984;), uso de radioterapia pré-operatória na tentativa de evitar a exenteração em pacientes com doença avançada (BORONOW 1973, HACHER et al 1984), o uso de radioterapia pós-operatória para diminuir a incidência de recorrência local em pacientes com múltiplos linfonodos comprometidos (HOMESLEY et al. 1986), a pesquisa de linfonodo sentinela para evitar as linfadenectomias radicais em pacientes com câncer de vulva inicial (MAKAR et al. 2001; VAN DER ZEE et al. 2008;), quimioterapia para pacientes com câncer de vulva avançado (LEISEROWITZ et al. 1997; BERIWAL et al. 2008;) e ressecção de linfonodos “bulky” positivos sem



completa dissecação linfonodal para diminuir o risco de linfedema antes da radioterapia sem comprometimento de sobrevida (HYDE et al. 2007).

Em nossa casuística, de janeiro de 1980 a junho de 2016, em relação à cirurgia do tumor primário, de 110 pacientes com metástase linfonodal, 102 (92,7%) foram submetidas a vulvectomia radical e 8 (7,3%) a ressecção local ampliada. Vinte e quatro (21,8%) pacientes foram submetidas a reconstrução com retalhos miocutâneos (grácil, 20; reto abdominal 2; fascía lata 1; glúteo 1). Oitenta e três (75,4%) pacientes foram submetidas a linfadenectomia inguinal bilateral e 27 (24,6%) a linfadenectomia inguinal unilateral. Dezoito (16,4%) casos foram também submetidos a linfadenectomia pélvica.

Sobre considerações prognósticas e também terapêuticas, a família ERBB (HER1 (EGFR), HER2, HER3 e HER4) tem sido identificada como um marcador de prognóstico em muitos cânceres, incluindo mama (GAO et al. 2007), bexiga (WANG et al. 2007), cólon (WEI et al. 2011), cabeça e pescoço (REIMER et al. 2007) e não-pequenas células de câncer de pulmão (RAY et al. 2009). EGFR foi estudado extensivamente em VSCC (carcinoma espinocelular de vulva) (BERCHUCK et al. 1990; JOHNSON et al. 1997; OONK et al. 2007). EGFR é comumente expressa em VSCC e tem sido sugerido para desempenhar um papel na transformação maligna e propagação nodal (CLANCY et al. 2016).

Muito já foi investigado em relação ao EGFR e câncer de vulva. DE MELO MAIA et al. em 2013 indicaram que a positividade de expressão da proteína EGFR infere em um fenótipo tumoral mais agressivo. Foi observado que os tumores positivos para o EGFR desenvolveram um perfil com maior profundidade na invasão, bem como a presença de recorrência da doença. Entretanto, nenhuma

associação a quaisquer outras características tais como tipo histológico, estadiamento, invasão perineural e vascular foram observados. Este fato pode ser de alguma forma explicado pela presença de marcação citoplasmática e também pela heterogeneidade intratumoral frequente observada dentre os casos estudados.

O estudo de JOHNSON et al. (1997) foi a primeira menção de marcação citoplasmática do EGFR em tumores da vulva, observada em 5 de 61 pacientes, o equivalente a 8,19% dos casos, mas nenhuma associação com características clínicas foi avaliada. Em DE MELO MAIA et al. (2013) 21,33% dos tumores apresentaram marcação citoplasmática e, à semelhança de resultados relatados em estudos de carcinoma de células renais, tumores com marcação de EGFR na membrana mostrou pior sobrevida quando comparados com aqueles com a marcação estritamente citoplasmática (PU et al. 2009). Entre os tumores com qualquer marcação citoplasmática, nenhum apresentou metástases nodais e, portanto, esse tipo de marcação de EGFR parece ter um potencial protetor na doença.

É importante ressaltar que um novo papel para o EGFR, além da molécula de transdução de sinal tradicional, tem emergido. EGFR também pode funcionar como um fator de transcrição do sinal citoplasma-núcleo. Neste sentido, os diferentes locais desta molécula no interior da célula podem ser associados com a progressão da doença e o prognóstico (LANGNER et al. 2004; PU et al. 2009). Assim, a caracterização da localização do EGFR pode ser importante para a terapia de gene-alvo e não deve ser considerada como um dado isolado na carcinogênese da vulva. Outra característica importante investigada no estudo DE MELO MAIA et al. 2013 foi a heterogeneidade intratumoral do EGFR. Esta característica também foi observada por BRUSTMANN (2007) em carcinomas da vulva. Dentre os casos do

primeiro estudo, a heterogeneidade do tumor foi associada à presença de metástase linfonodal, mas não ao nível da invasão do tumor. Isto sugere que os tumores heterogêneos apresentam subclones com um potencial metastático, em vez de agressividade local, que corroboram com menores proporções de sobrevida do grupo de pacientes com tumores heterogêneos. Por conseguinte, a heterogeneidade tumoral parece estar associada com mau prognóstico. A heterogeneidade de EGFR pode também ter importância quando se trata, principalmente, de terapia-alvo.

Inibidores de tirosina-quinase anti- EGFR foram demonstrados como eficazes (1) no tratamento do câncer de vulva localmente avançado em que a abordagem cirúrgica primária está muitas vezes associada com elevada morbidade e mortalidade (OLAWAIYE et al. 2007), (2) combinada com a terapia com cisplatina, conforme mostrado por RICHARD et al. (2008), em um relato de caso onde uma resposta parcial de palição dos sintomas por 5 meses, foi obtido em um recorrente carcinoma metastático vulvar e, mais recentemente, (3) um ensaio clínico de Fase II está avaliando erlotinib no tratamento dos carcinomas da vulva e onde benefícios clínicos já foram observados (HOROWITZ et al. 2012).

O EGFR é descrito, não só como um marcador de prognóstico da neoplasia da vulva, como mostrado anteriormente, mas também como uma ferramenta poderosa para a previsão da resposta terapêutica e terapia-alvo. No entanto, uma questão importante a ser abordada é a utilização de pequenas biópsias e/ou Microarranjos de Tecido (TMA) como uma ferramenta para analisar o EGFR no câncer de vulva.

A nossa amostra foi avaliada através de TMA e os resultados demonstraram ausência de correlação entre a marcação por imunistoquímica entre o tumor

primário e a metástase. As diferenças de expressão de EGFR entre os dois sítios, podem sugerir uma possível heterogeneidade da marcação do EGFR no câncer de vulva ou mesmo à real diferença entre a expressão do tumor primário e da metástase. Isto também tem sido amplamente relatado em outros estudos, principalmente na área de câncer de pulmão (JAKOBSEN et al. 2013; BAI et al. 2013; GROB et al. 2013), onde pode ter importância na resistência à terapia alvo (JAKOBSEN et al. 2013; BAI et al. 2013; GROB et al. 2013)

Com relação à aplicabilidade clínica envolvendo o EGFR e o câncer de vulva, em 2007, Olawaiye et al. publicaram os dois primeiros casos de carcinoma de células escamosas localmente avançado tratado com erlotinib na dose de 150 mg por dia. Respostas dramáticas foram observadas em ambos os casos antes da terceira semana de tratamento, mas ambos os pacientes morreram de várias co-morbidades e a duração das respostas foi limitada (1 e 2 meses) (OLAWAIYE et al. 2007).

O erlotinibe é um medicamento oral de boa tolerabilidade. Nesta visão, aparece como um tratamento atraente para o carcinoma de vulva avançado. Outros inibidores de EGFR foram investigados para o tratamento de carcinoma de células escamosas. Uma combinação de cetuximabe (anticorpo monoclonal anti-EGFR) e cisplatina foi eficiente em um paciente com carcinoma de vulva metastático recorrente (RICHARD et al. 2008). Gefitinib, outro inibidor de EGFR combinado com trastuzumab, um anti-HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2) foi investigado em uma linhagem de carcinoma de vulva humano (A431), e parece aumentar a radiosensibilidade (FUKUTOME et al. 2006).

Anticorpos monoclonais (mAbs) e inibidores de pequena molécula alvo EGFR e HER2 apresentam benefícios clínicos no tratamento de vários tipos de

cânceres, mas sua eficácia clínica é limitada pela ocorrência de resistência às drogas. HER3 é o parceiro preferencial de dimerização do HER2 e está bem estabelecido que a HER3 desempenha um papel importante na resistência a medicamentos de terapias de EGFR e HER2-multipataforma. Atualmente, anti-HER3 estão em diferentes fases de desenvolvimento clínico. No entanto, a falta de biomarcadores estabelecidos tornou mais desafiador estratificar os pacientes de câncer a quem terapias direcionadas ao HER3 poderiam ser mais eficazes (NINGYAN et al. 2016). Em nossa amostra, houve expressão de EGFR, HER2, HER3 e HER4 nos tumores primários em 28,8%, 2,8%, 3% e 76,8% dos casos, respectivamente.

Em relação às expressões imunoistoquímicas de EGFR e HER4 nos linfonodos inguinais metastáticos, foi positiva em 48,1% e 69,6% dos casos, respectivamente. Não houve expressão imunoistoquímica de HER2 e HER3 nos linfonodos inguinais metastáticos. Não foram encontradas relações entre as expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER2, HER3 e HER4 entre os tumores primários e as metástases linfonodais.

Com relação à aplicabilidade clínica, o EGFR e o HER2 têm sido extensivamente explorados em oncologia clínica e vários fármacos atualmente os direcionam terapêuticamente. No entanto, o HER3 e o HER4 ainda são pouco explorados. Com relação ao HER4, seu significado como um alvo terapêutico potencial permanece praticamente inexplorado, apesar de HER4 ser superexpresso ou mutado em muitos tumores sólidos.

Ao contrário do EGFR e o HER2, os dois membros mais estudados na família ERBB, o HER4 permanece em grande parte inexplorado em oncologia clínica como um alvo potencial. Vários estudos relataram mutações ativadoras no

HER4 no melanoma e no câncer de pulmão (PRICKETT et al. 2009). A expressão alterada de ERBB4 foi observada em câncer de mama, neuroblastoma, câncer de pulmão de não pequenas células e câncer de cólon (GRABINSKI e EWALD 2014, WILLIAMS et al. 2015; KURPPA et al. 2016). A superexpressão do HER4 está associada ao aumento do potencial metastático no sarcoma de Ewing (MENDOZA-NARANJO et al. 2013), mau prognóstico no câncer de mama triplo-negativo (KIM et al. 2016) e resistência a drogas em cânceres de ovário (GILMOUR et al. 2001). Embora muitas das drogas direcionadas à família do ERBB possam potencialmente inibir o HER4, não foram realizados estudos sistemáticos para resolver esse problema.

O EGFR já tem sido estudado extensamente em câncer de vulva, alguns estudos estendem à avaliação ao HER2. No entanto, sem protocolos aprovados de tratamento clínico. Por outro lado, não existe na literatura trabalhos analisando o HER3 e HER4 em câncer de vulva, nem no tumor primário, nem em metástase. Trata-se da primeira vez que este estudo é realizado, possibilitando perspectivas para análises futuras assim como acontece com o EGFR e HER2.

O que temos hoje como padrão para os casos avançados mostra que a recorrência ocorre em cerca de metade dos pacientes após o tratamento primário, incluindo cirurgia com ou sem quimiorradioterapia (LUPI et al. 1996). Tanto o tratamento quanto o resultado dependem do local e da extensão da recorrência. Recorrências locais sem envolvimento de nódulo regional podem ser gerenciadas com sucesso em muitos casos por excisão local repetida e / ou radioterapia, proporcionando uma taxa de sobrevida de 5 anos aproximada de 56%. Lesões recorrentes na área do linfonodo não passíveis de cirurgia ou radioterapia, bem como

em locais distantes, são mais difíceis de tratar e a taxa de sobrevivência em 5 anos é geralmente menor que 5% (LUPI et al. 1996).

O papel da quimioterapia, nesse cenário, é muito limitado e o objetivo é apenas paliativo. Os fármacos que têm sido utilizados incluem cisplatina, bleomicina, metotrexato e mais recentemente paclitaxel e vinorelbina com atividade mínima em pacientes frequentemente pré-tratados intensamente (DEPPE et al. 1979). Existe claramente a necessidade de abordagens terapêuticas mais eficazes.

Em resumo, um corpo crescente de literatura sugere que, enquanto os membros da família ERBB têm valor prognóstico limitado em cânceres ginecológicos, eles ainda representam potenciais alvos terapêuticos. Existe um grande abismo entre os promissores resultados *in vitro* e aqueles dos ensaios clínicos de ambos os inibidores de agente único, bem como regimes combinatórios de inibidores da família ERBB e quimioterapia.

Várias observações desses ensaios podem ser feitas. Em primeiro lugar, a maioria dos ensaios é realizada em pacientes com pré-tratamento intenso. É possível que a resposta a qualquer agente seja baixa nessa população. Em segundo lugar, muitos dos ensaios clínicos foram realizados em pacientes não selecionados, e poucos investigaram a expressão da família ERBB ou mutações específicas como parâmetros de tradução. A eficácia desses agentes em ensaios clínicos até este ponto pode não ser culpa do agente, mas sim de um projeto de teste ineficaz. A fim de identificar com precisão o subgrupo de pacientes que responderão a esses agentes, os ensaios clínicos devem começar a incluir a biologia molecular em seu desenho experimental.

Avanços da biologia molecular proporcionaram maior compreensão do câncer de vulva. Com isso veio uma melhor apreciação dos caminhos biológicos e mutações que impulsionam o seu desenvolvimento e progressão. Enquanto muitos novos tratamentos têm mostrado benefício em outras malignidades ginecológicas e cânceres associados a HPV, a investigação clínica do câncer de vulva com terapias alvos ainda é inicial. O conhecimento avançado da base molecular do câncer de vulva vem como oportunidade para melhorar o tratamento deste tipo de câncer negligenciado.



## 8 CONCLUSÕES

Em nosso estudo, podemos concluir:

- ✓ Foi encontrada expressão imunoistoquímica de EGFR, HER2, HER3 e HER4 no tumor primário e de EGFR e HER4 nos linfonodos inguinais metastáticos. Não houve expressão imunoistoquímica HER2 e HER3 nos linfonodos inguinais metastáticos. A expressão imunoistoquímica de HER-4 foi mais frequente em tumores <4cm quando comparados a tumores  $\geq$ 4cm. Não houve relação estatisticamente significativa entre as expressões de EGFR, HER2 e HER3 e as variáveis anatomopatológicas.
- ✓ As expressões de EGFR, HER2, HER3 e HER4 não tiveram impacto em sobrevida livre de doença ou sobrevida global.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Key statistics for vulvar cancer**. Last Revised: January 16, 2018. Available from: <URL:<https://www.cancer.org/cancer/vulvar-cancer/about/key-statistics.html>> [2018 set 12]

Abrão FS, Abrão MS. Câncer da vulva: diagnóstico, epidemiologia e estadiamento. In: Abrão FS, editor. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca; 1995. p.474-87.

Abrão FS, Baracat EC, Marques AF, et al. Carcinoma of the vulva. Clinicopathologic factors involved in inguinal and pelvic lymph node metastasis. **J Reprod Med** 1990; 35:1113-6.

Aragona AM, Cuneo N, Soderini AH, et al. Tailoring the treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the vulva: neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery: results from a multicenter study. **Int J Gynecol Cancer** 2012; 22:1258-63.

Aubele M, Auer G, Walch AK, et al. PTK (protein tyrosine kinase)-6 and HER2 and 4, but not HER1 and 3 predict long-term survival in breast carcinomas. **Br J Cancer** 2007; 96:801-7.

Badra FA, Karamouzis MV, Ravazoula P, et al. Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and epidermal growth factor receptor (EGFR) family expression. **Cancer Lett** 2006; 244:34-41.

Bai H, Wang Z, Wang Y, et al. Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. **PLoS One** 2013; 8:e54170.

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

Bell JG, Lea JS, Reid GC. Complete groin lymphadenectomy with preservation of the fascia lata in the treatment of vulvar carcinoma. **Gynecol Oncol** 2000; 77:314-8.

Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina. **Obstet Gynecol** 1990; 76:381-7.

Beriwal S, Coon D, Heron DE, et al. Preoperative intensity-modulated radiotherapy and chemotherapy for locally advanced vulvar cancer. **Gynecol Oncol** 2008; 109:291-5.

Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, et al. Comparison of real-time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. **J Clin Microbiol** 2004; 42:3758-65.

Boronow RC. Therapeutic alternative to primary exenteration for advanced vulvo-vaginal cancer. **Gynecol Oncol** 1973; 1:223-9.

Brandenberger AW, Rüdlinger R, Hänggi W, Bersinger NA, Dreher E. Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma: a study by in situ hybridisation. **Arch Gynecol Obstet** 1992; 252:31-35.

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; 26:481-9.

Burger MP, Hollema H, Emanuels AG, Krans M, Pras E, Bouma J. The importance of the groin node status for the survival of T1 and T2 vulvar carcinoma patients. **Gynecol Oncol** 1995; 57:327-34.

Burrell MO, Franklin EW III, Champion MJ, Crozier MA, Stacey DW. The modified radical vulvectomy with groin dissection: an eight-year experience. **Am J Obstet Gynecol** 1988; 159:715-22.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer** 1977; 39:456-66.

Cham S, Chen L, Burke WM, et al. Utilization and outcomes of sentinel lymph node biopsy for vulvar cancer. **Obstet Gynecol** 2016; 128:754-60.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signaling towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:505-16.

Clancy AA, Spaans JN, Weberpals JI. The forgotten woman's cancer: vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) and a targeted approach to therapy. **Ann Oncol** 2016; 27:1696-705.

Coleman RL, Ali S, Levenback CF, et al. Is bilateral lymphadenectomy for midline squamous carcinoma of the vulva always necessary? An analysis from Gynecologic Oncology Group (GOG) 173. **Gynecol Oncol** 2013; 128:155-9.

Curry SL, Wharton JT, Rutledge F. Positive lymph nodes in vulvar squamous carcinoma. **Gynecol Oncol** 1980; 9:63-7.

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, 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.

Deppe G, Cohen CJ, Bruckner HW. Chemotherapy of squamous cell carcinoma of the vulva: a review. **Gynecol Oncol** 1979; 7:345-8.

Disaia PJ, Creasman WM. **Clinical gynecology oncology**. 3 ed. St Louis: Mosby; 1989. Invasive cancer of the vulva; p.241-72.

Figge CD, Gaudenz R. Invasive carcinoma of the vulva. **Am J Obstet Gynecol** 1974; 119:382-7.

Finnegan TJ, Carey LA. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. **Future Oncol** 2007; 3:55-63.

Fukutome M, Maebayashi K, Nasu S, Seki K, Mitsushashi N. Enhancement of radiosensitivity by dual inhibition of the HER family with ZD1839 ("Iressa") and trastuzumab ("Herceptin"). **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 66:528-36.

Gao XP, Liu F. New agents in development for breast cancer. **Curr Opin Obstet Gynecol** 2007; 19:68-74.

Gill BS, Bernard ME, Lin JF, et al. Impact of adjuvant chemotherapy with radiation for node-positive vulvar cancer: a National Cancer Data Base (NCDB) analysis. **Gynecol Oncol** 2015; 137:365-72.

Gilmour LMR, Macleod KG, Mccaig A, Gullick WJ, Smyth Jf, Langdon SP. Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. **Cancer Res** 2001; 61:2169-76.

Girão MJC, Endo RM, Sartori MGF, et al. Câncer da vulva: estudo epidemiológico. **Ginecol Obstet Atual** 1995; 1:42-4.

Glaser S, Olawaiye A, Huang M, Beriwal S. Inguinal nodal region radiotherapy for vulvar cancer: are we missing the target again? **Gynecol Oncol** 2014; 135:583-5.

Grabinski N, Ewald F. Ibrutinib (Imbruvica™) potently inhibits ErbB receptor phosphorylation and cell viability of ErbB2-positive breast cancer cells. **Invest New Drugs** 2014; 32:1096-104.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. **Pharmacol Ther** 2004; 102:37-46.

Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Ann Oncol** 2008; 19:1523-9.

Greer BE, Koh WJ New NCCN Guidelines for vulvar cancer. **J Natl Compr Canc Netw** 2016; 14:656-8.

Grob TJ, Hoenig T, Clauditz TS, et al. Frequent intratumoral heterogeneity of EGFR gene copy gain in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2013; 79:221-7.

Growdon WB, Boisvert SL, Akhavanfard S, et al. Decreased survival in EGFR gene amplified vulvar carcinoma. **Gynecol Oncol** 2008; 111:289-97.

Hacker NF, Leuchter RS, Berek JS, Castaldo TW, Lagasse LD. Radical vulvectomy and bilateral inguinal lymphadenectomy through separate groin incisions. **Obstet Gynecol** 1981; 58:574-9.

Hacker NF, Berek JS, Juillard GJF, Lagasse LD. Preoperative radiation therapy for locally advanced vulvar cancer. **Cancer** 1984a; 54:2056-60.

Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Leuchter RS. Individualization of treatment for stage I squamous cell vulvar carcinoma. **Obstet Gynecol** 1984b; 63:155-62.

Hacker NF. Radical resection of vulvar malignancies: a paradigm shift in surgical approaches. **Curr Opin Obstet Gynecol** 1999; 11:61-64.

Hancock MC, Langton BC, Chan T, et al. A monoclonal antibody against the c-erbB-2 protein enhances the cytotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines. **Cancer Res** 1991; 51:4575-80.

Homesley HD, Bundy BN, Sedlis A, Adcock L. Radiation therapy versus pelvic node resection for carcinoma of the vulva with positive groin nodes. **Obstet Gynecol** 1986; 68:733-40.

Hopkins MP, Reid GC, Morley GW. The surgical management of recurrent squamous cell carcinoma of the vulva. **Obstet Gynecol** 1990; 75:1001-5.

Horowitz NS, Olawaiye AB, Borger DR, et al. Phase II trial of erlotinib in women with squamous cell carcinoma of the vulva. **Gynecol Oncol** 2012; 127:141-6.

Hyde SE, Valmadre S, Hacker NF, Schilthuis MS, Van Der Velden J. Squamous cell carcinoma of the vulva with bulky positive groin nodes – nodal debulking versus full groin dissection prior to radiation therapy. **Int J Gynecol Cancer** 2007; 17:154-8.

Hynes NE, Lane HA. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Iversen T, Abeler V, Aalders J. Individualized treatment of stage I carcinoma of the vulva. **Obstet Gynecol** 1981; 57:85-9.

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

Jakobsen JN, Santoni-Rugiu E, Ravn J, Sorensen JB. Intratumour variation of biomarker expression by immunohistochemistry in resectable non-small cell lung cancer. **Eur J Cancer** 2013; 49:2494-503.

Jeong EG, Soung YH, Lee SH, et al. ErbB3 Kinase domain mutations are rare in lung, breast and colon carcinomas. **Int J Cancer** 2006; 119:2986-7.

Johnson GA, Mannel R, Khalifa M, et al. Epidermal growth factor receptor in vulvar malignancies and its relationship to metastasis and patient survival. **Gynecol Oncol** 1997; 65:425-9.

Karamouzis MV, Badra FA, Papavassiliou AG. Breast Cancer: the upgraded role of HER3 and HER4. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:851-6.

Katz A, Eifel PJ, Jhingran A, Levenback CF. The role of radiation therapy in preventing regional recurrences of invasive squamous cell carcinoma of the vulva. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 57:409-18.

Kim J-Y, Jung HH, Do I-G, et al. Prognostic value of ERBB4 expression in patients with triple negative breast cancer. **BMC Cancer** 2016; 16:138.

Knopp S, Nesland Jm, Trope' C, Holm R. P14ARF, a prognostic predictor in HPV-negative vulvar carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2006; 126:266-76.



Kole M, Robison K. Sentinel lymph node evaluation in vulvar cancer: the new standard of care. **J Cancer Clin Trials** 2016; 1:115.

Kurppa KJ, Denessiouk K, Johnson MS, Elenius K. Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer. **Oncogene** 2016; 35:1283-91.

Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation? **J Clin Pathol** 2004; 57:773-5.

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 MSc. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:31-9.

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

Lee Y, Cho S, Seo JH, et al. Correlated expression of erbB-3 with hormone receptor expression and favorable clinical outcome in invasive ductal carcinomas of the breast. **Am J Clin Pathol** 2007; 128:1041-9.

Leiserowitz GS, Russell AH, Kinney WK, Smith LH, Taylor MH, Scudder AS. Prophylactic chemoradiation of inguinal femoral lymph nodes in patients with locally extensive vulvar cancer. **Gynecol Oncol** 1997; 66:509-14.

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

Levenback CF, Ali S, Coleman RL, et al. Mapeamento linfático e biópsia de linfonodo sentinela em mulheres com carcinoma de células escamosas da vulva: um estudo em grupo de oncologia ginecológica. **J Clin Oncol** 2012; 31:3786-91.

Lupi G, Raspaliesi F, Zucali R, et al. Combined preoperative chemoradiotherapy followed by radical surgery in locally advanced vulvar carcinoma: a pilot study. **Cancer** 1996; 77:1472-8.

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.

Makar APH, Scheistroen M, Van Den Weyngaert D, Trope CG. Surgical management of stage I and II vulvar câncer: the role of sentinela node biopsy: review of literature. **Int J Gynecol Cancer** 2001; 11:255-62.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. **Oncogene** 2000; 19:6550-65.

Mendoza-Naranjo A, El-Naggar A, Wai DH, et al. ERBB4 confers metastatic capacity in Ewing sarcoma. **EMBO Mol Med** 2013; 5:1019-34.

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene** 2007; 26:6469-87.

Moore DH, Ali S, Koh WJ, et al. A fase II trial of radiation therapy and weekly cisplatin chemotherapy for the treatment of locally-advanced squamous cell carcinoma of the vulva: a gynecologic oncology group study. **Gynecol Oncol** 2012; 124:529-33.

Moore RG, Depasquale SE, Steinhoff MM, et al. Sentinel node identification and the ability to detect metastatic tumor to inguinal lymph nodes in squamous cell cancer of the vulva. **Gynecol Oncol** 2003; 89:475-9.

Moore RG, Robison K, Brown AK, et al. Isolated sentinel lymph node dissection with conservative management in patients with squamous cell carcinoma of the vulva: a prospective trial. **Gynecol Oncol** 2008; 109:65-70.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. **Arch Surg** 1992; 127:392-9.

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End Results-SEER. **Cancer statistics facts heets: vulvar cancer**. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html>> [2018 jun 12]

Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. **Clin Cancer Res** 2003; 9:5078-84.

Nilsson T, Alm P, Malmström H, Simonsen E, Tropé C. A 16-year-old girl with invasive carcinoma in the vulva. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1990; 69:541-2.

Olawaiye A, Lee LM, Krasner C, Horowitz N. Treatment of squamous cell vulvar cancer with the anti-EGFR tyrosine kinase inhibitor Tarceva. **Gynecol Oncol** 2007; 106:628-30.

Onnis A, Marchetti M, Maggino T. Carcinoma of the vulva: critical analysis of survival and treatment of recurrences. **Eur J Gynaecol Oncol** 1992; 13:480-5.

Oonk MH, De Bock GH, Van Der Veen DJ, ET AL. EGFR expression is associated with groin node metastases in vulvar cancer, but does not improve their prediction. **Gynecol Oncol** 2007; 104:109-13.

Oonk MH, Van Hemel BM, Hollema H, et al. Size of sentinel-node metastasis and chances of non-sentinel-node involvement and survival in early stage vulvar cancer: results from GROINSS-V, a multicentre observational study. **Lancet Oncol** 2010; 11:646-52.

Pal M, Bandyopadhyay S. Cancer de vulva. In: Dutta DK, editor. **Recent advances in gynecology**. India: Jaypee Brothers Medical Publ.; 2011. p.1-13.

Palisoul ML, Mullen MM, Feldman R, Thaker PH. Identification of molecular targets in vulvar cancers. **Gynecol Oncol** 2017; 216:305-13.

Pegram MD, Pienkowski T, Northfelt DW, et al. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:759-69.

Perez CA, Grigsby RW. Vulva. In: Perez CA, Brady LW, editor. **Principles and practice of radiation gynecologic oncology**. Philadelphia: Lippincott; 1992. p.1273-89.

Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. **Oncogene** 1995; 10:2435-46.

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.

Podratz KC, Symmonds RE, Taylor WF. Carcinoma of the vulva: analysis of treatment failures. **Am J Obstet Gynecol** 1982; 143:340-51.

Podratz KC, Symmonds RE, Taylor WF, Williams TJ. Carcinoma of the vulva: analysis of treatment and survival. **Obstet Gynecol** 1983; 61:63-74.

Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. **Nat Genet** 2009; 41:1127-32.

Pu YS, Huang CY, Kuo YZ, et al. Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma. **J Biomed Sci** 2009; 16:82.

Ray M, Salgia R, Vokes EE. The role of EGFR inhibition in the treatment of nonsmall cell lung cancer. **Oncologist** 2009; 14:1116-30.

Reade CJ, Eiriksson LR, Mackay H. Systemic therapy in squamous cell carcinoma of the vulva: current status and future directions. **Gynecol Oncol** 2014; 132:780-9.

Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. **Int J Cancer** 2007; 120:1731-8.

Richard SD, Krivak TC, Beriwal S, Zorn KK. Recurrent metastatic vulvar carcinoma treated with cisplatin plus cetuximab. **Int J Gynecol Cancer** 2008; 18:1132-5.

Robison K, Roque D, McCourt C, et al. Long-term follow-up of vulvar cancer patients evaluated with sentinel lymph node biopsy alone. **Gynecol Oncol** 2014; 133:416-20.

Rose PG. Skin bridge recurrences in vulvar cancer: frequency and management. **Int J Gynecol Cancer** 1999; 9:508-11.

Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. **Stem Cells** 1998; 16:413-28.

Rottmann M, Beck T, Burges A, et al. Trends in surgery and outcomes of squamous cell vulvar cancer patients over a 16-year period (1998-2013): a population-based analysis. **J Cancer Res Clin Oncol** 2016; 142:1331-41.

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

Sartor CI, Zhou H, Kozłowska E, et al. EARP HS 3rd. Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. **Mol Cell Biol** 2001; 21:4265-75.

Sassen A, Rochon J, Wild P, et al. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R2.

Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. **Trends Mol Med** 2007; 13:527-34.

Shanbour KA, Mannel RS, Morris PC, Yadack A, Walker JL. Comparison of clinical versus surgical staging systems in vulvar cancer. **Obstet Gynecol** 1992; 80:927-30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:7-30.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235:177-82.

Slamon DJ, Leyland-JONES B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for meta- static breast cancer that overexpresses HER2. **N Engl J Med** 2001; 344:783-92.

Soni NK, Spillane AJ. Experience of sentinel node biopsy alone in early breast cancer without further axillary dissection in patients with negative sentinel node. **ANZ J Surg** 2005; 75:292-9.

Souen JS, Filassi JR, Chin HC, Motta EV. Câncer da vulva na clinica ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Rev Bras Ginecol Obstet** 1992; 14:87-92.

Stehman F, Bundy B, Dvoretzky P, Creasman W. Early stage I carcinoma of the vulva treated with ipsilateral superficial inguinal lymphadenectomy and modified radical hemivulvectomy: a prospective study of the Gynecologic Oncology Group. **Obstetr Gynecol** 1992; 79:490-7.

Stehman F, Bundy B, Bola H, Clarke-Pearson D. Sites of failure and times to failure in carcinoma of the vulva treated conservatively: a Gynecologic Oncology Group study. **Am J Obstetr Gynecol** 1996; 174:1128-32.

Suo Z, Yang H, Mei Q, et al. Type 1 protein tyrosine kinases in Chinese breast carcinomas: a clinicopathologic study. **Int J Surg Pathol** 2001; 9:177-87.

Terada KY, Shimizu DM, Jiang CS, Wong JH. Outcomes for patients with T1 squamous cell cancer of the vulva undergoing sentinel node biopsy. **Gynecol Oncol** 2006; 102:200-3.

Torres Lobaton A, Mendoza Tenorio A, Palacios Castillo A. Tratamiento quirúrgico del cáncer de la vulva: experiencia con 43 casos. **Ginecol Obstet Méx** 1983; 51:287-96.

Travis A, Pinder SE, Robertson JF, et al. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. **Br J Cancer** 1996; 74:229-33.

Van Der Horst EH, Murgia M, Treder M, et al. Anti-HER-3 MAbs inhibit HER-3-mediated signaling in breast cancer cell lines resistant to anti-HER-2 antibodies. **Int J Cancer** 2005; 115:519-27.

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

Wang X, Zhang S, Maclennan GT, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder. **Clin Cancer Res** 2007; 13:953-7.

Wei Q, Shui Y, Zheng S, et al. EGFR, HER2 and HER3 expression in primary colorectal carcinomas and corresponding metastases: implications for targeted radionuclidetherapy. **Oncol Rep** 2011; 25:3-11.

Williams CS, Bernard JK, Demory Beckler M, et al. ERBB4 is over-expressed in Ibrutinib inhibition of ERBB4 reduces cell growth 2249 human colon cancer and enhances cellular transformation. **Carcinogenesis** 2015; 36:710-8.

Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, et al. Expression of the HER1–4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. **J Pathol** 2003; 200:290-7.

Woelber L, Hess S, Bohlken H, et al. EGFR gene copy number increase in vulvar carcinomas is linked with poor clinical outcome. **J Clin Pathol** 2012; 65:133-9.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:2965-9.

Woolderink JM, De Bock GH, De Hullu JA, Davy MJ, Van Der Zee AG, Mourits MJ. Patterns and frequency of recurrences of squamous cell carcinoma of the vulva. **Gynecol Oncol** 2006; 103:293-9.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:127-37.



Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

Zaczek A, Welnicka-Jaskiewicz M, Bielawski KP, et al. Gene copy numbers of HER family in breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008; 134:271-9.