

**ALTERAÇÕES EM GENES SUPRESSORES DE
TUMOR EM CARCINOMA DE VULVA: CORRELAÇÃO
COM FATORES PROGNÓSTICOS ANATOMO-
PATOLÓGICOS, DADOS CLÍNICOS, INFECÇÃO POR
HPV E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS**

ANDRÉ MOURÃO LAVORATO DA ROCHA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

**Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Regina
Rogatto**

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rocha, André Mourão Lavorato da

Alterações em genes supressores de tumor em carcinoma de vulva: correlação com fatores prognósticos anátomo-patológicos, dados clínicos, infecção por HPV e expressão de proteínas / André Mourão Lavorato da Rocha – São Paulo, 2011.

134p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. NEOPLASIAS VULVARES. 2. INFECÇÕES POR PAPILLOMAVIRUS. 3. GENES SUPRESSORES DE TUMOR. 4. PROGNÓSTICO. 5. EXPRESSÃO GÊNICA.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, José Augusto Rocha e Maria Cândida Mourão Rocha, que mais do que ninguém, contribuíram com todo o apoio e incentivo para que eu obtivesse essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Rafael Malagoli Rocha por todos os ensinamentos e pela confiança depositada.

À minha co-orientadora Dra. Silva Rogatto pelo conhecimento transmitido.

À Dra. Mônica Stiepcich, Dra. Kátia Carvalho, ao Dr. Glauco Baiocchi e à Dra. Flávia Cestari pelo auxílio imprescindível para a realização desse trabalho.

À FAPESP e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Banco de Macromoléculas, Laboratório de Imuno-histoquímica, SAME e Arquivo de Anatomia patológica pelo auxílio prestado.

A Deus por tudo.

Aos meus Pais por toda minha formação, e em especial por todo o incentivo e apoio durante essa jornada.

Aos meus irmãos por acreditarem na minha capacidade.

Ao Marcelo pela atenção e pela força.

Aos amigos que fiz em São Paulo, aos que ficaram em Belo Horizonte e aos que vieram de lá, pelos bons momentos de diversão.

Às minhas cologas e amigas de estudos vulvares, Beatriz Maia e Iara Rodrigues pelo companheirismo.

RESUMO

Rocha AML. **Alterações em genes supressores de tumor em carcinoma de vulva: correlação com fatores prognósticos anátomo-patológicos, dados clínicos, infecção por HPV e expressão de proteínas.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma de vulva é um tumor de baixa ocorrência, sendo responsável por menos de 3% de todas neoplasias femininas. Sua incidência é de 1,8 a 20 para 100.000 mulheres, dependendo da faixa etária de abrangência. Em mulheres jovens a ocorrência da doença esta atrelada a fatores de risco como por tabagismo e infecção por HPV, e em mulheres acima dos 50 anos esse câncer ocorre por mecanismos genéticos ainda pouco elucidados. **Objetivo:** Identificar alterações em genes supressores de tumor, buscando correlacionar estas alterações com a presença de infecção por HPV para a determinação de valores prognósticos em carcinomas de vulva. **Métodos:** 139 casos de câncer de vulva foram selecionados dos prontuários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo. Foram avaliadas alterações em genes supressores de tumor através de técnicas de IHQ e FISH e qRT-PCR. **Resultados:** A idade das pacientes incluídas nesse trabalho variou entre 15 e 98 anos com uma mediana de 71 anos. A infecção por HPV estava presente em 41% dos casos. A relação entre a IHQ e as variáveis clínicas e anátomo-patológicas não demonstrou nenhuma relação com a infecção por HPV, e somente p14 demonstrou relação com a sobrevida das pacientes. As reações de FISH demonstraram perda de um ou dois alelos de *PTEN* e *TP53* em 3% e 6,3% dos casos, respectivamente. A avaliação da expressão gênica demonstrou maior expressão nas amostras tumorais quando comparadas às amostras normais para *CDKN2A* (p14 e p16) e *TP73*, o contrário foi observado para *CDKN1A*, *TP53* e *PTEN*. **Conclusões:** A expressão protéica de p14 representa pior prognóstico para as pacientes acometidas por carcinoma vulvar, enquanto as demais avaliadas não podem ser consideradas para essa finalidade.

SUMMARY

Rocha AML. [Tumor suppressor genes alterations in vulvar carcinoma: correlation with pathological and clinical data, HPV infection and protein expression]. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Vulvar carcinoma is a tumor of low occurrence, accounting for less than 3% of all female cancers. Its incidence varies from 1.8 to 20 per 100,000 women, depending on the age of coverage. In young women the occurrence of the disease is linked to risk factors such as smoking and infection by HPV, and in women over 50 years the cause of this cancer is poorly understood. **Aims:** Identify changes in tumor suppressor genes, trying to correlate these changes with the presence of HPV infection to determine prognostic values in vulvar carcinomas. **Methods:** 139 cases of vulvar carcinomas were selected from the files of the Department of Anatomic Pathology, Hospital A. C. Camargo. We assessed changes in tumor suppressor genes through FISH, IHC and qRT-PCR. **Results:** The age of the patients included in this study varied between 15 and 98 years with a median of 71 years. HPV infection was present in 41% of cases. The relationship between the IHC and the clinical and anatomic-pathological data showed no relationship to HPV infection, and only p14 correlated with survival of patients. FISH showed a loss of one or both alleles of *PTEN* and *TP53* in 3% and 5.3% of cases, respectively. The evaluation of gene expression showed increased expression in tumor samples compared to normal samples for *CDKN2A* (p14 and p16) and *TP73*. The opposite was observed for *CDKN1A*, *TP53* and *PTEN*. **Conclusions:** p14 protein expression represents a worse prognosis for patients affected by vulvar carcinoma, while the other evaluated can not be considered for this purpose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p14.....	46
Figura 2	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p16.....	47
Figura 3	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p21.....	48
Figura 4	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p27.....	49
Figura 5	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p53.....	50
Figura 6	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p63.....	51

Figura 7	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p73.....	52
Figura 8	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de pRb.....	53
Figura 9	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de PTEN.....	54
Figura 10	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de BRCA1.....	55
Figura 11	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à técnica de FISH para a avaliação do <i>status</i> gênico de <i>TP53</i>	57
Figura 12	Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à técnica de FISH para a avaliação do <i>status</i> gênico de <i>PTEN</i>	58
Figura 13	Relação entre a expressão dos genes <i>CDKN2A(p14)</i> , <i>CDKN2A(p16)</i> , <i>TP73</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB</i> e <i>BRCA1</i> em amostras normais e tumorais vulvares de pacientes operadas no hospital A.C. Camargo.....	61

Figura 14	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p14 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	70
Figura 15	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p16 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	72
Figura 16	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p21 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	74
Figura 17	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p27 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	76
Figura 18	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p53 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	78
Figura 19	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p63 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	80
Figura 20	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p73 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	82

Figura 21	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de pRb em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	85
Figura 22	Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de PTEN em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica e suas respectivas diluições padronizadas...	19
Tabela 2	Scores estabelecidos em estudos anteriores para a avaliação IHQ da expressão das seguintes proteínas supressoras de tumor: p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb, PTEN e BRCA1.....	21
Tabela 3	Idade média, mínima e máxima em relação à menarca, menopausa, coitarca e ao diagnóstico de carcinoma vulvar das 139 pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	34
Tabela 4	Dados Demográficos referentes a 139 pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.....	34
Tabela 5	Dados Clínicos referentes a 139 pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.....	39
Tabela 6	Duração média, mediana e variação mínima e máxima do tempo de aparecimento dos sintomas ao diagnóstico de carcinoma vulvar.....	40
Tabela 7	Dados anátomo-patológicos referentes a 139 pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.....	42

Tabela 8	Avaliação IHQ dos marcadores p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb, PTEN e BRCA1 em carcinomas vulvares invasivos de pacientes provenientes do hospital A.C. Camargo.....	44
Tabela 9	Avaliação dos genes <i>TP53</i> e <i>PTEN</i> por FISH e comparação com os resultados obtidos por IHQ, em carcinomas vulvares invasivos de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	56
Tabela 10	Avaliação da expressão dos genes <i>CDKN2A(p14)</i> , <i>CDKN2A(p16)</i> , <i>TP73</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB</i> e <i>BRCA1</i> em amostras normais e tumorais vulvares de pacientes operadas no Hospital A.C. Camargo.....	60
Tabela 11	Avaliação da expressão dos genes <i>CDKN2A(p14)</i> , <i>CDKN2A(p16)</i> , <i>TP73</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB</i> e <i>BRCA1</i> e comparação com a expressão protéica.....	62
Tabela 12	Porcentagem de infecção por HPV e tipo viral infectante nos carcinomas vulvares provenientes de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	63
Tabela 13	Associação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas com a infecção por HPV nos carcinomas vulvares provenientes de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	65
Tabela 14	Associação entre a expressão das proteínas supressoras de tumor p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb, PTEN, e BRCA1 com a infecção por HPV nos carcinomas vulvares provenientes do Hospital A.C. Camargo.....	66
Tabela 15	Associação entre a SCE e SLD com a expressão IHQ de p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb e PTEN.....	68

Tabela 16	Associação entre a expressão IHQ de p14 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	69
Tabela 17	Associação entre a expressão IHQ de p16 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	71
Tabela 18	Associação entre a expressão IHQ de p21 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	73
Tabela 19	Associação entre a expressão IHQ de p27 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	75
Tabela 20	Associação entre a expressão IHQ de p53 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	77
Tabela 21	Associação entre a expressão IHQ de p63 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	79
Tabela 22	Associação entre a expressão IHQ de p73 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	81
Tabela 23	Associação entre a expressão IHQ de pRb com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	84
Tabela 24	Associação entre a expressão IHQ de PTEN com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.....	86

Tabela 25	Associação entre a expressão das proteínas supressoras de tumor (p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73 e pRb) mediante a análise IHQ em amostras teciduais provenientes de pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.....	88
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CEC	carcinoma de células escamosas
BIC	Breast Cancer Information Core Database
B2M	β -2-microglobulina
DBD	Domínio de ligação ao DNA
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FISH	Hibridação Fluorescente <i>In Situ</i>
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
HPRT	Hipoxantina – guanina fosforibosil transferase
HPV	Papilomavírus Humano
IHQ	Imuno-Histoquímica
NCI	National Cancer Institute
NIV	Neoplasia Intraepitelial Vulvar
OD	Domínio de oligamerização caRBoxi-terminal
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
QRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
SCE	Sobrevida câncer específica
SLD	Sobrevida livre de doença
TAD	Domínio de transativação amino-terminal
TBP	TATA box protein
TMA	Microarranjo de tecido

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer de vulva – Caracterização e Epidemiologia	1
1.2	Aspectos anátomo-patológicos.....	4
1.3	Genes supressores de tumor	5
1.3.1	Gene Retinoblastoma (RB).....	6
1.3.2.	TP53, TP63 e TP73.....	7
1.3.3	Inibidores de cinases dependents de ciclinas (CDKI's).....	9
1.3.4	CDKN2A (p14).....	11
1.3.5	PTEN	11
1.3.6	BRCA1.....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos	14
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	16
4.1	Pacientes e espécimes anátomo-patológicos.....	16
4.2	A construção do microarranjo de tecido (TMA)	17
4.3	A imuno-histoquímica (IHQ)	18
4.4	A hibridação in situ fluorescente (FISH)	24
4.5	A análise de imagens	25
4.6	A extração de RNA de tecido a fresco.....	25
4.7	Transcrição reversa - Obtenção de cDNA	27
4.8	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	28
4.9	A análise estatística.....	31

5	RESULTADOS.....	33
5.1	Dados Demográficos, Clínicos e Anátomo-patológicos.....	33
5.1.1	Dados Demográficos	33
5.1.2	Dados Clínicos e de tratamento	38
5.1.3	Dados Anátomo-patológicos.....	41
5.2	Imuno-histoquímica (IHQ).....	44
5.2.1	p14	45
5.2.2	p16	46
5.2.3	p21	48
5.2.4	p27	49
5.2.5	p53	50
5.2.6	p63	51
5.2.7	p73	52
5.2.8	pRb.....	53
5.2.9	PTEN	54
5.2.10	BRCA1.....	55
5.3	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	56
5.3.1	TP53.....	56
5.3.2	PTEN.....	57
5.4	Reação em Cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real (qRT-PCR).....	59
5.5	Papilomavírus Humano – HPV	63
5.6	Variáveis clínicas e Anátomo-patológicas X expressão protéica	67
5.6.1	p14	68
5.6.2	p16	70
5.6.3	p21	72
5.6.4	p27	74
5.6.5	p53	76
5.6.5.	p63	78
5.6.7	p73	80
5.6.8	pRb.....	83
5.6.9	PTEN	85

5.7	Relação entre a expressão das proteínas p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73 e pRb	87
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	115
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

ANEXOS

Anexo 1	Estadiamento FIGO (2009) para os carcinomas vulvares
Anexo 2	Produção Científica vinculada à Dissertação:
	A Trabalhos publicados em congressos
	B Artigos submetidos para Periódicos
	C Artigos em fase de submissão
Anexo 3	Próximos Passos

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE VULVA – CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Os tumores malignos são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade na população feminina (GUNVER et al. 2009). A região vulvar compreende os lábios menores, lábios maiores, clitóris e intróito vaginal. O câncer vulvar acomete a região externa do aparelho reprodutor feminino (LEIBOWITCH et al. 1990).

O carcinoma vulvar é uma doença rara que representa 3-5% de todos os tumores malignos no trato genital feminino (CREASMAN et al. 1997; LANDIS et al. 1998; Nogueira et al. 2006). A incidência desse tumor cresceu cerca de 2,4% ao ano entre os anos de 1992-1998 (JONES et al. 1997; HOWE et al. 2001). Além disso, a partir de meados da década de 1980 a 1998, as taxas de mortalidade subiram em mulheres brancas e caíram em mulheres negras (HOWE et al. 2001). O National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos estimou que 4,340 novos casos de câncer vulvar serão diagnosticados no país no ano de 2011, levando à morte 940 mulheres (JOURA et al. 2000; NCI 2009). O mesmo instituto mostrou que a incidência de câncer vulvar entre 2004 e 2008 para todas as raças foi de 1,8 por 100.000 mulheres, no entanto, esse índice variou de 0,9 a 2,4 em asiáticas e mulheres brancas, respectivamente (JOURA et al. 2000; NCI 2009).

No ano de 1992, Recife apareceu como uma das cidades com maior incidência de câncer vulvar no mundo, com uma taxa de 4,6/100.000 mulheres por ano (PARKIN et al. 1992). Desde então, poucos dados têm sido publicados, embora entre 2000 e 2005, Recife ainda aparecesse com alta incidência quando comparada com outras cidades brasileiras (1,18 por 100.000 mulheres/ano). Outras cidades no mesmo período de tempo mostraram elevada incidência, como Goiânia (1,28 por 100.000 mulheres/ano) e Campo Grande (1,3 por 100.000 mulheres/ano) no entanto, o maior registro foi de São Paulo, com 1,44 por 100.000 mulheres/ano (Ministério da Saúde 2007). A frequência relativa de câncer vulvar entre todos os cânceres femininos em São Paulo permaneceu quase constante, com taxas de 0,4 a 0,5% entre os anos de 2000 a 2004. A incidência de câncer vulvar em mulheres com menos de 60 anos não chega a mais de 1,67 por 100.000 mulheres/ano, porém naquelas com mais de 60 anos esta taxa cresce rapidamente atingindo 20,87 por 100.000 mulheres/ano nas mulheres com mais de 85 anos de idade (Ministério da Saúde 2007).

Essa doença não possui sinais e sintomas característicos, porém entre os sintomas mais comumente observados estão o prurido vulvar, ardor, sangramento, nódulo ou ulceração e áreas da pele com cor e textura alteradas (STROUP et al. 2008). Cerca de 10% das doentes são assintomáticas. Os tratamentos seguem o preconizado pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO) e variam de tratamentos superficiais e pequenas cirurgias até vulvectomias radicais com linfadenectomia (PECORELLI 2009).

Estudos prévios consideravam o carcinoma vulvar como uma enfermidade de mulheres em idade avançada (American Cancer Society-ACS 2011) (com idades entre 65 e 75 anos) (MESSING e GALLUP 1995), no entanto, nas últimas décadas sua incidência tem aumentado em mulheres mais jovens (NCI 2009; LANNEAU et al. 2009), possivelmente devido à maior frequência de lesões precursoras do tipo neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV) e sua associação com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (LANNEAU et al. 2009; WOELBER et al. 2009). Além disso, associações do vírus HPV com o tabagismo já foram estudadas, sugerindo que nesses casos o fumo pode estar associado ao risco aumentado de desenvolvimento do carcinoma vulvar devido às vias imunossupressoras (HUSSAIN et al. 2008). Além desses, o risco de desenvolver a doença também pode estar atrelado a aspectos hormonais, reprodutivos, comportamentais e genéticos tais como a presença de doenças inflamatórias crônicas, presença ou histórico de verrugas genitais e/ou outros carcinomas genitais (PINTO 2002; DAVIDSON et al. 2003), além de idade avançada (PINTO 2002).

As NIVs são classificadas quanto a sua relação ou não com a infecção por HPV, são elas: usual (clássica, ou bowenóide) quando associada à infecção por HPV, ou diferenciada (ou simplex) quando não está associada à infecção por HPV. A primeira ocorre predominantemente em pacientes mais jovens e tende a ser multifocal e multicêntrica, já a segunda acomete mulheres mais velhas e é menos comum que a NIV usual, além de

poder estar associada ao Líquen Escleroso, uma desordem não-neoplásica da região vulvar (VAN SETERS et al. 2007).

1.2 ASPECTOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

Dos carcinomas vulvares invasivos os tumores epiteliais escamosos representam a grande maioria dos casos (90%), e podem ser divididos em subtipos histológicos distintos, designados como basalóide, condilomatoso, verrucoso e ceratinizado/não ceratinizado, sendo que os dois primeiros estão relacionados à infecção por HPV, enquanto os de tipo verrucoso e ceratinizado/não ceratinizado parecem não ter relação com este tipo de infecção viral (KURMAN et al. 1993; KNOPP et al. 2006, 2009).

O tipo viral de HPV mais comum entre os cânceres vulvares é o HPV 16 (DENNY e NGAN 2006; INSINGA et al. 2008) que é um tipo de alto risco de malignidade (zur Hause 2002). Tanto ele quanto os demais tipos de HPV possuem em seu genoma viral genes que codificam as oncoproteínas E6 e E7, que são capazes de imortalizar, independentemente, diversos tipos de células humanas em cultura, embora a eficiência de imortalização seja maior quando ambas são expressas ao mesmo tempo (ZUR HAUSEN 2002). Essas proteínas possuem essa capacidade por interagirem, regularem e degradarem os supressores tumorais pRb e p53, respectivamente (ZUR HAUSEN 2002). Esta capacidade de imortalização não é observada entre os HPVs de baixo risco (ZUR HAUSEN 2002).

1.3 GENES SUPRESSORES DE TUMOR

O mecanismo de tumorigênese é complexo e envolve diversos processos cumulativos de alterações genéticas, tais quais mutações, inserções, perda de heterozigose, deleções, entre outras, bem como ativação de oncogenes e alterações epigenéticas. Como mecanismo de defesa frente a essas alterações, dezenas de genes supressores tumorais atuam inibindo a progressão no ciclo celular, favorecendo a apoptose ou reparando o DNA, e portanto, podem ter um papel relevante no câncer de vulva (PLASS 2002).

São inúmeras as vias de controle ao ciclo celular, e muitas delas interagem promovendo interferências na proliferação celular, seja por parada no ciclo celular, seja promovendo apoptose. Nesse contexto se destacam as vias ARF/MDM2/p53 e INK4/ciclina-CDK/pRb que possuem diversas interações com outras proteínas (STOTT et al. 1998; SHERR e ROBERTS 1999; KNOPP et al. 2009).

Na via ARF/MDM2/p53 a proteína p14 atua degradando MDM2 conseqüentemente estabilizando p53 (STOTT et al. 1998). Essa última, por sua vez, atua em duas vertentes, uma promovendo a apoptose e a outra levando a expressão de p21, uma proteína membro da família das inibidoras de CDKs (CDKI) (STOTT et al. 1998). As CDKIs são compostas por diversas proteínas, entre elas a p16, p21 e p27, que regulam negativamente os complexos ciclina-CDK, impedindo que o produto do gene do retinoblastoma (pRb) seja fosforilado, dessa forma impedindo a progressão no ciclo celular

(SHERR e ROBERTS 1999; DU e POGORILER 2006). Além disso, existem proteínas com grande homologia à p53 capazes de atuar sobre seus alvos, são elas a p63 e a p73 (DEYOUNG e ELLISEN 2007; PIETSCH et al. 2008).

A atuação dessas proteínas é dependente de uma fina regulação celular, e podem ser alteradas por meio de ação de agentes externos, sendo o HPV um dos principais exemplos. (ZUR HAUSEN 2002). As proteínas E6 e E7 dos tipos de HPV considerados de alto risco, atuam sobre p53 e pRb respectivamente, inibindo-as ou degradando-as (ZUR HAUSEN 2002).

1.3.1 Gene Retinoblastoma (*RB*)

O gene *RB* controla o ciclo e a diferenciação celular, e para isso o produto desse gene (pRb) interage com diversas proteínas, sendo o fator de transcrição E2F uma das mais conhecidas (DU e POGORILER 2006). Em carcinomas vulvares já foi observada uma diminuição progressiva na expressão de pRb2/p130 em alterações não neoplásicas, NIVs e carcinomas invasivos, respectivamente (ZAMPARELLI et al. 2001). Contrastando com esse achado está o estudo conduzido por KNOPP et al. (2006) que encontrou pRb e pRb fosforilada muito expressas em, respectivamente, 93,5% e 41,5% dos casos de carcinomas vulvares. Achado semelhante foi percebido por LERMA et al. (2002) em um estudo envolvendo um número pequeno de casos. Nesse estudo 21% das amostras demonstraram ausência de pRb e por isso sugeriram que a perda de expressão dessa proteína esteja envolvida com eventos secundários do tumor. A expressão

anormal de pRb também já foi associada a um pior prognóstico (ROLFE et al. 2001).

1.3.2 TP53, TP63 e TP73

Um dos supressores tumorais mais estudados é o gene *TP53*, codificador da proteína p53 que, por sua vez, é envolvida na regulação do ciclo celular entre as fases G1 e S, no reparo do DNA, na inibição de mutações espontâneas, na diferenciação celular e na apoptose (LANE 1992; VOGELSTEIN et al. 2000). Em vulva, um dos fatores que aparecem como predisponentes para a carcinogênese é a desregulação em p53 e as alterações em sua atividade (LEE et al. 1994). Essas alterações podem ocorrer de duas formas no carcinoma vulvar: a primeira envolvendo a oncoproteína E6 proveniente da infecção por HPV, que tem como função degradar a p53, e a outra forma através de maneiras alternativas tais quais mutações do gene *TP53* que podem promover uma alteração na proteína ou até mesmo impedir que ela seja formada (KAGIE et al. 1997a). A maioria dos estudos em carcinomas de vulva avalia o *status* de p53 e desses, grande parte a relaciona com a infecção por HPV (LEE et al. 1994, SANTOS et al. 2006; KAGIE et al. 1997a). Nos estudos de SANTOS et al. (2006) e KAGIE et al. (1997a) p53 foi encontrada com alta expressão em 6,2% e 33% dos casos HPV-positivos e em 57-64,5% dos HPV-negativos.

As proteínas p63 e p73, codificadas pelos genes *TP63* e *TP73*, possuem como p53 um domínio de transativação amino-terminal (TAD), um domínio de ligação ao DNA (DBD), e um domínio de oligomerização carboxi-terminal (OD) (MURRAY-ZMIJEWSKI et al. 2006). Em TAD e OD,

tanto p63 quanto p73 possuem pouca similaridade com p53, porém no DBD eles chegam a apresentar 60% de similaridade, incluindo a conservação de resíduos essenciais de contato ao DNA (DEYOUNG e ELLISEN 2007; PIETSCH et al. 2008). Essa similaridade permite que essas duas proteínas regulem diversos genes alvos de p53, incluindo alguns envolvidos em processos de apoptose e parada no ciclo celular (DEYOUNG e ELLISEN 2007; PIETSCH et al. 2008).

A proteína p63 possui duas principais formas, uma contendo a porção amino terminal (TA) homóloga a da p53, e outra com essa porção ausente (ΔN). A variante $\Delta Np63$ age como repressora de transcrição de uma forma dominante-negativa para opor a transativação promovida tanto por p53 quanto por TAp63 *in vitro* e *in vivo* (VAN BOKHOVEN e BRUNNER 2002; HIGASHIKAWA et al. 2007). Em carcinomas vulvares a relação entre p63 e carcinomas vulvares ainda é pouco conhecida, apesar de já se saber que em uma linhagem celular de carcinoma vulvar a baixa expressão de $\Delta Np63a$ promovida pela proteína Snail aumenta o poder de invasão das células tumorais quando E-caderina também tem seus níveis reduzidos (HIGASHIKAWA et al. 2007).

A p73 está envolvida no ciclo celular, no reparo do DNA, na inibição do crescimento celular e apoptose, geralmente atuando sobre genes responsivos à p53, que também são passíveis de ativação promovida pela p73 (SCHABATH et al. 2006; GALLÌ et al. 2009). A p73, assim como a p63, possui diversas isoformas geradas por splicings alternativos (DE LAURENZI et al. 1998; UEDA et al. 1999; O'NIONS et al. 2001). Muitas dessas

isoformas são expressas nos ceratinócios (DE LAURENZI, 1998) e em epitélio vulvar as mais predominantes são as α e γ (O'NIONS et al. 2001). Outra particularidade da vulva é o fato de p73 perder a restrição normal de expressão nos tecidos basais e suprabasais quando o tecido está acometido por alguma NIV ou carcinoma (O'NIONS et al. 2001). Nesses casos a expressão de p73 é observada em toda a extensão do epitélio. Em um estudo conduzido por O'NIONS et al. (2001) a isoforma mais predominante foi a $\Delta 2$ em alguns casos ela foi a única detectável. Essa isoforma está relacionada à inibição da transativação de p53 e da TAp73 (O'NIONS et al. 2001; FILLIPOVICH et al. 2001).

1.3.3 Inibidores de cinase dependentes de ciclinas (CDKI's)

Duas grandes famílias de proteínas, que são chamadas de inibidoras de cinases dependentes de ciclinas, são responsáveis pela inibição da progressão do ciclo celular. A família INK4 consiste nas proteínas p15^{INK4b}, p16^{INK4a} (p16), p18^{INK4c}, p19^{INK4d} e atua inibindo CDK4 e CDK6, enquanto a família CIP/KIP é constituída pela p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2} e atua sobre as ciclinas D, E e A (SHERR e ROBERTS 1999; KNOPP et al. 2009).

A p16, membro da família INK4, é um importante supressor de tumor já bastante descrito em carcinomas vulvares. Ela atua inibindo a progressão do ciclo celular e, por isso, quando está ausente permite um aumento na fosforilação de pRb, com subsequente liberação do fator de transcrição E2F (SHERR e ROBERTS 1999; MILDE-LANGOSCH e RIETHDORF 2003). Esse processo pode ocorrer por diminuição da expressão ou mesmo por

mutações nessa proteína (MILDE-LANGOSCH e RIETHDORF 2003). A expressão de p16 está fortemente associada à infecção por HPV em carcinomas vulvares (RUFFORNY 2005; SANTOS et al. 2006). Já nos casos em que há diminuição ou ausência de expressão o silenciamento por mecanismos epigenéticos parece ser o principal mecanismo envolvido, demonstrando que esse provavelmente é um evento precoce, mas que é insuficiente para a transformação maligna (LERMA et al. 2002).

Diferente da família INK4 que se liga as CDKs, a família CIP/KIP interage com o complexo ciclina-CDK (SHERR e ROBERTS 1999; LEE e KIM 2009).

A CDKI p21 promove a parada no ciclo celular em G1 em resposta a uma série de estímulos, entre eles a proteína p53 que medeia o checkpoint induzido por dano ao DNA através da transativação de diversos genes envolvidos na parada do ciclo celular e na apoptose (STOTT et al. 1998; ABBAS e DUTTA 2009). Nos carcinomas vulvares a expressão de p21 foi relacionada ao pior prognóstico em pacientes estadiadas como FIGO I e II. Nesses casos as mulheres acometidas pela doença possuem uma sobrevida menor (KNOPP et al. 2004).

A p27 é capaz de atuar sobre diversos complexos ciclina-CDK no ciclo celular e é um exemplar de CDKI cuja desregulação, e pouco freqüentemente a mutação, é encontrada em diversos cânceres (CHU et al. 2008; LEE e KIM 2009). Sua ação de supressora tumoral ocorre no compartimento nuclear, portanto quando translocada para o citoplasma sua função é prejudicada e um pior prognóstico é atribuído à doença

(VERVOORTS e LÜSCHER 2008). Em relação ao carcinoma vulvar a marcação nuclear para p27 é pouco observada, estando ausente em lesões pré-malignas, desordens epiteliais não neoplásicas e em tecido vulvar normal (ZAMPARELLI et al. 2001; KNOPP et al. 2004).

1.3.4 CDKN2A (p14)

A p14^{ARF} (p14) é codificada no mesmo locus INK4a/ARF que p16, situado no cromossomo 9p21.23 (HABER 1997; LLOYD 2000). p14 exerce sua função supressora se ligando à MDM2 e inibindo a ubiquitinação de p53, assim permitindo sua estabilização e a promoção dos seus efeitos anti tumorais (STOTT et al. 1998; KNOPP et al. 2009). A expressão de p14 aumentada geralmente é acompanhada por um aumento na expressão de MDM2, p53 e p21, porém existem muitos tumores em que p53 está com sua função ou expressão comprometida por processos como a expressão da oncoproteína viral E6 do HPV. Nesses tumores p14, mesmo expressa não possui efeito algum (STOTT et al. 1998; KNOPP et al. 2009). KNOPP et al. (2006) encontraram correlação significativa entre os casos de carcinomas vulvares HPV positivos e a expressão aumentada de p14 que também foi relacionada a uma maior sobrevida nas mulheres acometidas pelo carcinoma vulvar.

1.3.5 PTEN

A proteína PTEN exerce um papel fundamental enquanto fosfatase lipídica na supressão do crescimento celular (MAEHAMA e DIXON 1998;

MYERS et al. 1998; GOBERDHAN e WILSON 2003). Ela age antagonizando os efeitos da PI3-cinase e seu substrato que ativa a Akt, que por sua vez bloqueia a apoptose e estimula a proliferação (GOBERDHAN e WILSON 2003). As mutações em *PTEN* são geralmente encontradas em uma série de tumores incluindo os cânceres endometriais, de próstata, glioblastomas e melanomas (MAEHAMA et al. 2001; GOBERDHAN e WILSON 2003), e em vulva essas alterações já foram descritas em 60% dos casos de carcinoma avaliados por HOLWAY et al. (2000).

1.3.6 BRCA1

O gene *BRCA1* possui grande importância no controle do ciclo celular e principalmente em processos de reparo do DNA envolvendo recombinações homólogas (WANG et al. 2001; ESTEVES et al. 2009). Ele é muito estudado em câncer de mama, ovário e tuba uterina, e nesses sítios sua relação já é bem descrita principalmente com síndromes familiares de mutações germinativas (ESTEVES et al. 2009; AL-MULLA et al. 2009). Mulheres com mutações no gene *BRCA1* apresentam 80-90% mais riscos de desenvolverem câncer de mama e 40-65% de sofrerem de câncer de ovário (FORD et al. 1994; AL-MULLA et al. 2009). Existem mais de 1560 tipos de mutações descritas para esse gene, segundo o Breast Cancer Information Core Database (BIC) (AL-MULLA et al. 2009). Diferentes alterações genéticas neste gene resultam em riscos diferentes ao desenvolvimento de câncer. Em carcinomas vulvares a literatura é carente de estudos da expressão destes genes.

2 JUSTIFICATIVA

A literatura ainda é escassa e controversa a respeito da avaliação molecular do *status dos* genes supressores de tumor, bem como de sua expressão protéica, em carcinomas de vulva. A importância prognóstica de alterações de expressão destas proteínas e alterações gênicas ainda é questionável neste tipo de carcinoma. Desta forma, é necessário que se determine a correlação existente entre estes fatores, bem como elucidar seus mecanismos de ação intracelular na patogênese do carcinoma de vulva para melhorar a compreensão no que se refere às particularidades moleculares do câncer de vulva, contribuindo para o conhecimento dessa neoplasia e para o delineamento prognóstico mais acurado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações em genes supressores de tumor, bem como alterações de sua expressão protéica, buscando correlacionar estas alterações com a presença de infecção por tipos específicos de HPV para a determinação de valores prognósticos para carcinomas de vulva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar, através de imuno-histoquímica (IHQ), a expressão das seguintes proteínas provenientes de genes supressores de tumor: BRCA1, p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, PTEN e pRb;
- 2- Avaliar, através de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), polissomias, monossomias, deleções ou amplificações dos seguintes genes: *TP53* e *PTEN*;
- 3- Identificar, nas amostras com tecido a fresco disponível, a expressão dos seguintes genes: *CDKN2A(p16)*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *TP53*, *TP63*, *TP73*, *CDKN2A(p14)*, *RB*, *PTEN* e *BRCA1* utilizando PCR quantitativo em tempo real para a mensuração de transcrito em tecido a fresco;

- 4- Comparar as alterações de expressão gênica, tanto mRNA quanto proteína, com infecção e subtipo infectante de HPV, fatores prognósticos bem estabelecidos em anatomia patológica, dados clínicos das pacientes e tempo de sobrevida.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 PACIENTES E ESPÉCIMES ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

Cento e trinta e nove carcinomas invasivos vulvares de diferentes subtipos histológicos foram selecionados de forma retrospectiva e aleatória dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo no período de janeiro 1979 a 2006. Foram considerados critérios de inclusão apresentar diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma epidermóide invasor da vulva, e de exclusão os casos com radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes e os casos que não dispusessem de material suficiente para as análises ou que apresentassem falta de informações clínicas. As amostras em parafina foram obtidas do Arquivo da Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo e as amostras de tecido a fresco foram fornecidas pelo Biobanco da mesma instituição. A confirmação diagnóstica foi feita pela patologista Dra. Mônica Maria Ágata Stiepcich por meio de cortes histológicos corados com HE e os blocos correspondentes foram resgatados para a confecção de dois microarranjos de tecido para estudo IHQ e FISH. Todas as dezesseis amostras de tecido a fresco com material tumoral com borda normal pareada foram resgatadas do banco de tumores do Hospital A C Camargo e o DNA e o RNA foram extraídos com auxílio do Banco de Macromoléculas da mesma instituição. O DNA foi utilizado para a realização da tipagem de HPV enquanto o RNA foi utilizado para o PCR

quantitativo em tempo real. A tipagem dos HPVs foi realizada por uma aluna de doutorado membro do grupo de estudos em Carcinomas vulvares, Iara Sant'ana Rodrigues, utilizando a metodologia AMPLICOR® HPV test *LINEAR ARRAY* (ROCHE). A metodologia utilizada para a verificação da infecção pelo HPV permitiu também a avaliação dos tipos virais responsáveis pela infecção. As reações foram realizadas utilizando o DNA dos tecidos a fresco disponíveis e dos tecidos emblocados em parafina para aqueles casos que não dispunham de material congelado.

Os seguintes dados demográficos, clínicos e anátomo patológicos das pacientes foram coletados dos prontuários do hospital: etnia, estado civil, escolaridade, uso de anticoncepcional, hábitos etílicos e tabagistas, número de parceiros sexuais, de gestações e de partos, idade ao diagnóstico, à menarca, à coitarca e à menopausa, sintomas e duração dos mesmos, tratamentos cirúrgicos, quimioterápicos e radioterápicos, estadiamento, presença e padrão da recidiva, status no último segmento, tipo histológico, invasão vascular e perineural, metástase linfonodal e profundidade da invasão.

4.2 A CONSTRUÇÃO DO MICROARRANJO DE TECIDO (TMA)

Os casos foram selecionados após avaliação e revisão por uma patologista com grande experiência em tumores ginecológicos. Os blocos dos tumores selecionados foram utilizados para construção de dois TMAs e as áreas representativas dos tumores foram cuidadosamente selecionadas

em lâminas coradas por HE. As áreas tumorais selecionadas foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do Manual Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments Micro-array technology, Silver Spring, USA). Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra, compreendendo regiões diferentes do tumor e depositadas de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata e com espaço de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes seriados do bloco de TMA foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas à -20°C no freezer e foram posteriormente utilizadas para o estudo IHQ e FISH.

4.3 A IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura postos em lâminas com carga elétrica (StarFrost®). As lâminas de TMA foram acondicionadas *overnight* em estufa a 60°C para reduzir a camada de parafina e por vinte minutos em xilol antes das reações. As reações foram realizadas de forma automatizada no equipamento Benchmark XT® (Ventana Medical Systems, Tucson, USA). As lâminas foram identificadas com etiquetas do próprio equipamento referentes ao protocolo padronizado para as reações e depois foram acomodadas nas termo-pads. A recuperação antigênica e as reações de imuno-histoquímica foram realizadas integralmente pelo próprio equipamento com reagentes da mesma empresa responsável pelo equipamento. Com exceção da

pipetagem dos anticorpos toda a reação foi feita de forma automatizada, com a bandeja de lâminas fechada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek®/Prisma®/Film® - Sakura, Torrance, California).

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica e suas respectivas diluições padronizadas.

Genes supressores de tumor			
Proteína	Clone	Fabricante	Diluição Padronizada
BRCA1	GLK2	DAKO	1:100
p14	DCS-240	Abcam	1:50
p16	Ab-3	NeoMarkers	1:400
p21	SX118	DAKO	1:25
p27	SX53G8	DAKO	1:100
p53	DO-7	DAKO	1:4000
p63	4A4	DAKO	1:100
p73	ER-15	Abcam	1:100
PTEN	6H2.1	Cascade	1:100
pRb	13A10	Novocastra	1:300

As lâminas foram digitalizadas no equipamento APERIO® (APERIO®, Vista, USA) e a análise das imagens feita no programa analisador de imagens (Scope, APERIO®, Vista, USA).

Os resultados das reações de IHQ foram definidos, em sua maioria, a partir de scores adaptados de outros autores (**Tabela 2**) que avaliaram a expressão dos marcadores incluídos nesse estudo, em carcinomas vulvares. Foram feitas adaptações aos scores estabelecidos por outros trabalhos, para adequar a metodologia de avaliação desses trabalhos à utilizada no presente estudo. Aqueles marcadores que não dispunham de trabalhos disponíveis em carcinomas vulvares foram escolhidos de acordo com os clones utilizados para que as variações em relação à marcação fossem minimizadas. A extratificação dos resultados foi feita subdividindo os casos em negativos, fraco positivos e forte positivos. Essa estratificação foi mantida para todos os marcadores com exceção do p14 que apresentou marcação nucleolar, não passível de avaliação pelo equipamento avaliador de marcação. Nessa avaliação a extratificação foi feita em negativos e positivos.

Tabela 2 - Scores estabelecidos em estudos anteriores para a avaliação IHQ da expressão das seguintes proteínas supressoras de tumor: p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb, PTEN e BRCA1.

Marcadores e scores			
Referência(s)	Marcador	Status	Scores
Knopp et al. 2006	p14	Positivo	Qualquer marcação em mais de 5% das células
Nogueira et al. 2006	p16	Negativo	Casos com 0 ou 1 de intensidade de marcação
			Casos com 2 ou 3 de intensidade com menos de 5% das células marcadas
		Fraco positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente entre 5% e 50% das células
		Forte positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células
Knopp et al. 2004	p21	Negativo	Casos com 0 ou 1 de intensidade de marcação
			Casos com 2 ou 3 de intensidade com menos de 5% das células marcadas
		Fraco positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente entre 5% e 50% das células
		Forte positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células
Zamparelli et al. 2001	p27	Negativo	Casos com 0 ou 1 de intensidade de marcação
			Casos com 2 ou 3 de intensidade com menos de 5% das células marcadas
Knopp et al. 2004		Fraco positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente entre 5% e 50% das células
		Forte positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células
Kagie et al. 1997a e b	p53	Negativo	Casos com 0 ou 1 de intensidade de marcação
			Casos com 2 ou 3 de intensidade com menos de 5% das células marcadas
Knopp et al. 2004		Fraco positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente entre 5% e 50% das células
Nogueira et al. 2006		Forte positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células

Cont./ Tabela 2

Koga et al. 2003	p63		A porcentagem de células marcadas foi multiplicada pela intensidade de marcação e foi feita uma mediana. Acima da mediana os valores foram considerados positivos e abaixo negativos.
Uramoto et al. 2006			
Uramoto et al. 2006	p73	Negativo	Casos com 0 ou 1 de intensidade de marcação
		Fraco positivo	Casos com 2 ou 3 de intensidade com menos de 10% das células marcadas
		Forte positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente entre 10% e 50% das células
			Intensidade 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células
Knopp et al. 2006	pRb	Negativo	Casos com 0 ou 1 de intensidade de marcação
		Fraco positivo	Casos com 2 ou 3 de intensidade com menos de 5% das células marcadas
		Forte positivo	Intensidade 2 ou 3 com marcação presente entre 5% e 50% das células
			Intensidade 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células
Lin et al. 2009	PTEN	Negativo	Casos com 0 de intensidade de marcação
		Fraco positivo	Casos com 1, 2 ou 3 de intensidade com menos de 10% das células marcadas
		Forte positivo	Intensidade 1, 2 ou 3 com marcação presente entre 10% e 50% das células
			Intensidade 1, 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células
Kim et al. 2011	BRCA1	Negativo	Casos com 0 de intensidade de marcação
		Fraco positivo	Casos com 1, 2 ou 3 de intensidade com menos de 10% das células marcadas
		Forte positivo	Intensidade 1, 2 ou 3 com marcação presente entre 10% e 50% das células
			Intensidade 1, 2 ou 3 com marcação presente em mais de 50% das células

A associação entre a marcação IHQ com a infecção por HPV e as variáveis clínicas e anátomo-patológicas foram realizadas utilizando como base para os cálculos os casos negativos e positivos,, sendo este ultimo a

soma dos casos considerados como fraco e forte positivos. Essa estratificação foi estabelecida para fortalecer as análises e para permitir uma análise estatística mais robusta devido ao pequeno número de amostras em alguns casos classificados com fraca ou forte expressão.

O grau histológico não foi relacionado à expressão dos supressores de tumor uma vez que a estratificação estabelecida para essa variável incluiu poucas amostras em cada grupo, o que impossibilitou os cálculos estatísticos.

A proteína BRCA1 não foi passível de associação com a infecção por HPV, com as variáveis clínicas e anátomo-patológicas e com a Sobrevida Câncer específica e Sobrevida Livre de Doença uma vez que o número de casos negativos para a expressão dessa proteína foi muito baixo. A proteína PTEN também não foi passível em relação à infecção por HPV uma vez que o número de casos em que ela foi expressa foi irrelevante nos casos em que a tipagem de HPV foi feita.

Em relação à associação entre a expressão protéica dos supressores de tumor e a Sobrevida Livre de Doença e a Sobrevida Câncer Específica, os cálculos foram feitos unindo os grupos fraco e forte positivos, pois quando separados em três grupos o número amostral em cada um deles não permitiu uma análise estatisticamente adequada. Esse padrão foi seguido em todas as análises com exceção de p14 que somente apresentou dois grupos, um negativo e o outro positivo.

4.4 A HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

Foram utilizadas sondas Kreatech® (Amsterdam, Holanda) e Vysis® (Abbott Molecular, Illinois, USA) para os ensaios de FISH para os genes *TP53* e *PTEN*. Após a desparafinização em duas lavagens com xilol 100% de 5 minutos cada, as lâminas foram reidratadas por meio de duas lavagens com etanol 100% de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com 0,2mmol/L de HCl por 20 minutos, com água destilada por 2 minutos e com 2X tampão citrato (SSC; NaCl 0,3mmol/L e citrato de sódio 0,03mmol/L) por 3 minutos. As lâminas foram, então, incubadas nesse mesmo tampão por 30 minutos a 82°C em banho-maria; as lâminas foram incubadas por 36 minutos a 37°C em tampão de protease (0,05mmol/L Tris-HCl pH 7,8, 0,01mmol/L ácido etileno diamino tetraacético, e 0,01mmol/L NaCl) para a digestão protéica. Finalmente, as lâminas foram adicionadas à formalina 10% em tampão salina fosfato por 10 minutos. A desidratação foi realizada com três mudanças consecutivas de etanol 70%, 85% e 100%. Tanto a sonda para o FISH quanto o DNA alvo foram desnaturados juntamente por 5 minutos a 75°C e incubados 44 horas a 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão pós-hibridação (SSC e NP40) por 3 minutos a 74°C e montadas com contraste DAPI (SSC 2X/0,03 ug/mL 4',6-diaminido-2-fenilindoleidihidroclorato) para a identificação dos núcleos. As lâminas foram digitalizadas e avaliadas no equipamento Ariol® (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

4.5 A ANÁLISE DE IMAGENS

Para a análise das lâminas de imuno-histoquímica, estas foram digitalizadas em equipamento digitalizador de lâminas (APERIO®, Vista, USA) e a intensidade de marcação IHQ, bem como a porcentagem de células marcadas de cada caso foram analisadas de forma automatizada por programa analisador de imagens (Scope, APERIO®, Vista, USA).

Para a análise das lâminas de FISH, estas foram digitalizadas em equipamento digitalizador de lâminas (Ariol® - Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e a avaliação dos sinais fluorescentes foi feita de forma manual através da análise das imagens geradas.

A avaliação visual de 20% de todos os discos de TMA foi feita para avaliar a concordância entre a avaliação visual e a avaliação fornecida pelo programa analisador de imagens.

4.6 A EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDO A FRESCO

Para a extração de RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit. A princípio foram adicionados 10 µl de β-Mercaptoethanol (β-ME) para cada 1 ml Buffer RLT. Em temperatura ambiente, foram pipetados 600 µl do Buffer RLT nos tubos com beads magnéticos do Kit Precellys®. Em seguida foram removidos os excessos de Tissuetek® e com o auxílio de um bisturi foi cortado o máximo do tecido sem descongelar. O tecido obtido foi colocado no tubo com a solução de lise e homogeneizado por 10 segundos na

velocidade máxima (5.500rpm). Imediatamente após este processo as amostras, então, foram acondicionadas no gelo até o próximo ciclo, respeitando o limite máximo de 3 ciclos de 10 segundos na velocidade máxima. Em sequência o conteúdo do tubo de bead magnético foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml e centrifugado por 3 minutos à velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e usado para as outras reações enquanto o pellet foi armazenado para a extração de DNA. Ao lisado foi adicionado o mesmo volume de ETOH 80% que foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta. Então, 700ul dessa solução homogenia foi transferido para a coluna RNeasy spin column que estava inserida em um tubo de coleta de 2 ml fornecido pelo kit. Durante 15 segundos à 10.000 rpm a solução foi centrifugada e então o fluído contido no tubo de coleta foi descartado. O restante da solução supracitada foi inserido na mesma coluna RNeasy spin column da respectiva amostra e centrifugada da mesma forma. Em seguida uma série de reagentes foram adicionados e centrifugados na coluna com o intuito de lavar a coluna. A princípio foram colocados 700µl do Buffer RW1 na coluna RNeasy spin column e este foi centrifugado por 15 segundos à 10.000 rpm. Em seguida 500µl do Buffer RPE com ETOH 100% (já preparado) foi centrifugado por 15 segundos à 10.000 rpm na coluna RNeasy spin column. Mais 500 µl do Buffer RPE com ETOH 100% foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. Por fim 500µl do ETOH 80% foram adicionados na coluna e centrifugados por 2 minutos à 10.000 rpm. Todos os fluidos recolhidos pelo tubo de coleta foram descartados após cada processo acima

referido. Durante 1 minuto a coluna foi centrifugada à velocidade máxima (13.200 rpm) para remover o excesso de etanol da coluna. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5 ml (fornecido pelo kit) e a ela foi adicionado ~ 30ul de RNase-free water no meio da membrana da coluna e em seguida esta foi incubada por 1 minuto a 42°C na estufa. Por fim centrifugamos por 1 minuto à velocidade máxima (13.200 rpm) para eluir o RNA e o eluato passou novamente pela coluna e foi centrifugado por 1 minuto à velocidade máxima (13.200 rpm). O material obtido ficou armazenado à -80°C até o momento da utilização.

4.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA - OBTENÇÃO DE cDNA

O cDNA foi obtido pela técnica de RT-PCR. Esta técnica foi realizada a partir de 2 µg de RNA total, diluído em um volume final de 20 µL de água ultra pura estéril utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo especificações do fabricante. Foram adicionados 2µl de iniciadores hexâmeros randômicos (concentração inicial 0,1 µg/µl) e esta mistura foi minifugada e incubada, primeiramente em banho seco por 7 minutos a 65°C, para a desnaturação das fitas de RNA e posteriormente em gelo por 2 minutos.

Nesta solução foram acrescentados 2µl de tampão de reação 10x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; KCl 75mM), 50 mM MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP) (1µL), 5U/µl de *Multescribe Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Grand Island, USA) (1µL), 0,1M de

dietiltreitol (DTT) (Invitrogen) (1 μ L). A reação foi incubada a 50°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita de cDNA. As amostras foram submetidas a diluição com água pura estéril para atingir uma concentração final de aproximadamente 25 η g/ μ L e estocadas a -20°C.

4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

As reações de qRT-PCR foram realizadas no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado o sistema de detecção *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), o qual utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, através da atividade 5' exonuclease da Taq DNA polimerase em sondas marcadas com corantes fluorescentes (TaqMan® - Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Essas sondas, específicas para o segmento gênico cuja expressão se deseja estudar, apresentam uma substância (fluoróforo na posição 5' da sonda) capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por substância (*quencher*) presente na extremidade 3' da sonda. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação. Por outro lado, se a reação for capaz de gerar produtos (amplicons),

a sonda irá hibridizar-se com esse alvo gerado e ficará exposta à atividade de exonuclease da polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do *quencher* que agora não mais será capaz de absorver a luz emitida.

Como iniciadores da reação de polimerização foram obtidos Assays (conjunto de primers) inventoriados pela Applied Biosystems do Brasil, para cada gene alvo a ser investigado. Como controles endógenos foram testados *GAPDH* (gliceraldeído fosfato desidrogenase), *β -actina*, *TBP* (TATA box protein), *B2M* (β -2-microglobulina,) e *HPRT* (hipoxantina – guanina fosforibosil transferase). Após serem obtidos os valores de expressão de cada um dos genes em nosso conjunto de amostras, esses dados foram submetidos à análise pelo programa GeNorm (<http://medgen.ugen.be/~jvdesomp/genorm/>), o qual possibilitou determinar o *HPRT* como o gene normalizante, por apresentar razões de expressão mais estável entre as amostras do estudo.

As reações foram realizadas com amostras tumorais de carcinoma vulvar pareadas a amostras de vulva normal provenientes de bordas tumorais da mesma paciente e as análises dos dados gerados foram feitas comparando os grupos de vulvas tumorais e normais.

As reações de qRT-PCR para a avaliação dos transcritos dos genes *CDKN2A(p16)*, *CDKN1A*, *TP53*, *TP63*, *TP73*, *CDKN2A(p14)*, *RB*, *PTEN* e *BRCA1* foram realizadas utilizando o aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Todas as reações foram normalizadas com o gene endógeno *HPRT* que, segundo a análise no programa GeNorm, foi o mais estável. Todas as amostras tumorais foram pareadas com amostras normais, provenientes de bordas tumorais das mesmas pacientes.

As amostras foram avaliadas comparando dois grupos, o primeiro de vulvas tumorais (VT) e o segundo de vulvas normais (VN), provenientes de borda tumoral das mesmas pacientes. Essas amostras eram compostas por 10 amostras HPV positivas, 5 HPV negativas e 1 indeterminada. Não foi possível separar os grupos em amostras HPV positivas e negativas uma vez que o número amostral foi muito pequeno em cada grupo.

A avaliação do RNAm do gene *CDKN1B* não foi realizada pois o assay comprado, apesar de constar a proteína p27 como produto de expressão, não possuía a sequência correta conforme observado no Reference Sequence (RefSeq) (National Center for Biotechnology Information NCBI 2011).

A avaliação da expressão gênica de *TP63* também apresentou problemas e, portanto não foi incluída nas análises dessa dissertação. A reação inicial de qRT-PCR para *TP63* apresentou uma intensa amplificação ainda nos primeiros ciclos o que nos levou a aumentar a diluição do cDNA. Realizamos então diluições de 10 vezes, 50 vezes e 100 vezes do cDNA com o intuito de sanar o problema e estabelecer uma faixa de diluição para realizarmos a técnica, contudo as amostras se mostraram bastante heterogêneas em relação à expressão, com algumas ainda permanecendo super expressas mesmo em altas diluições, enquanto em outras a

expressão deixou de ser observada. Dessa forma, e também levando em consideração a escassez de material proveniente de tecido a fresco, interrompemos as tentativas de padronizar a reação para *TP63*.

Também foram realizadas reações de Imunohistoquímica para cada proteína expressa pelos referidos genes em cortes inteiros de tecidos normais provenientes de borda de tumor e em tecidos tumorais, correspondentes aos casos utilizados para as reações de qRT-PCR. Em nenhuma dessas reações foi possível avaliar a relação estatística da expressão gênica com a IHQ, uma vez que o número amostral foi muito pequeno. Também não foi possível estabelecer relação com as variáveis clínicas e anátomo-patológicas pelo mesmo motivo descrito acima.

4.9 A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram digitados e arquivados em um banco de dados com auxílio do software *Excel da Microsoft*. Para as variáveis quantitativas foram apresentadas as principais medidas resumo, como média, desvio-padrão, valor mínimo e valor máximo e para as variáveis qualitativas foram apresentadas as respectivas distribuições de frequências absolutas e relativas.

Associações entre variáveis qualitativas foram avaliadas por meio do teste qui-quadrado. No caso de frequências esperadas inferiores a cinco foi realizada a correção de continuidade proposta por YATES (1934).

Nas análises de sobrevida câncer específica e livre de doença/recidiva, foi empregada a técnica de Kaplan-Meier. A diferença entre curvas de sobrevida foi avaliada pelo teste de Logrank.

O software livre R versão 2.13 foi empregado na análise estatística (R Development Core Team (2010), Vienna, Austria. url: <http://www.R-project.org>).

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

A avaliação dos Dados Demográficos esta contida nas **Tabelas 3 e 4**, dos Dados Clínicos nas **Tabelas 5 e 6** e dos Dados Anátomo-patológicos na **Tabela 7**.

5.1.1 Dados Demográficos

Em relação à idade ao diagnóstico a média obtida foi de 69 anos, e a mediana de 71 anos, variando entre 15 e 98 anos conforme observado na **Tabela 3**. Na **Tabela 4** podem ser observados os dados em relação a etnia. Entre as mulheres avaliadas cento e vinte (88,9%) apresentaram-se como sendo da raça branca, seguidos por 13 (9,6%) de pardas, 2 (1,5%) negras e nenhuma amarela (0%). Em quatro casos os dados não estavam presentes, portanto foram incluídos como “ignorados”.

Tabela 3 - Idade média, mínima e máxima em relação à menarca, menopausa, coitarca e ao diagnóstico de carcinoma vulvar das 139 pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo.

Dados demográficos	Idade Mínima	Idade Máxima	Média	Mediana	Desvio Padrão	Ignorados
Idade ao diagnóstico	15	98	69	71	12,42	0
Idade da menarca	10	20	14	13	2,43	43
Idade da menopausa	38	64	50	50	11,0	32
Idade da Coitarca	11	43	21	20	7,1	81

Tabela 4 - Dados Demográficos referentes a 139 pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.

Dados demográficos	Número de pacientes	Porcentagem
Etnia		
Branca	120	88,9
Negra	2	1,5
Parda	13	9,6
Amarela	0	0
Ignorado*	4	2,9
Estado Civil		
Solteira	12	9,0
Casada	67	50,0
Separada	4	3,0
Viúva	51	38,1
Ignorado*	5	3,6
Escolaridade		
Analfabeta	38	33,9
1º grau incompleto	49	43,8
1º grau completo	1	0,9
2º grau incompleto	13	11,6
2º grau completo	6	5,4
Superior incompleto	0	0
Superior completo	4	3,6
Ignorado*	27	19,4

Cont./ Tabela 4

Anticoncepcional		
Não	102	94,4
Sim-atual	0	0
Sim-passado	6	5,6
Ignorado*	31	22,3
Etilismo		
Não	123	99,2
Sim-atual	0	0
Sim-passado	1	0,8
Ignorado*	15	10,8
Tabagismo		
Não	106	84,8
Sim-atual	10	8
Sim-passado	9	7,2
Ignorado*	14	10,1
Número de parceiros sexuais		
0 (zero)	4	6,2
1 (um)	57	87,7
2 (dois)	2	3,1
3 (três)	0	0
4 (quatro)	2	3,1
>4 (mais de quatro)	0	0
Incontáveis	0	0
Ignorado*	74	53,2
Número de gestações		
0	10	8,1
1-4 (uma a quatro)	43	34,7
5-10 (cinco a dez)	48	38,7
>10 (mais de dez)	23	18,5
Ignorado*	15	10,8
Número de partos		
0	12	9,4
1-4 (uma a quatro)	48	37,8
5-10 (cinco a dez)	52	40,9
>10 (mais de dez)	15	11,8
Ignorado*	12	8,6
Número de abortos		
0	72	58,1
1-4 (uma a quatro)	48	38,7
5-10 (cinco a dez)	3	2,4
>10 (mais de dez)	1	0,8
Ignorado*	15	10,8

*Os casos ignorados foram calculados a partir do número total de pacientes incluídas, já os demais cálculos foram feitos subtraindo o número de casos ignorados.

Das pacientes com carcinoma vulvar deste trabalho 12 (9,0%) eram mulheres solteiras ao diagnóstico, 67 (50,0%) se declararam casadas, 4 (3,0%) eram separadas, 51 (38,1%) eram viúvas e em 5 dos casos não foi possível obter a informação acerca do estado civil.

A grande maioria das mulheres incluídas possuía pouco grau de instrução escolar, 38 (33,9%) e 49 (43,8%) correspondiam respectivamente a mulheres analfabetas e com o 1º grau incompleto. O restante das pacientes foi diluído nos demais patamares de educação: 1 (0,9%) com 1º grau completo, 13 (11,6%) com o 2º grau incompleto, 6 (5,4%) com 2º grau completo, 0 com nível superior incompleto e 4 (3,6%) com o superior completo. Ainda, em 27 prontuários essas informações não foram encontradas.

Dados em relação à idade média e mediana da menarca, coitarca e menopausa também foram coletados, e essas foram respectivamente, 14 e 13 anos, 50 e 50 anos, e 21 e 20 anos. A idade mínima para a menarca foi de 10 anos, para a coitarca 11 anos e para a menopausa 38 anos. As máximas foram de 20 anos para a menarca, 43 anos para a coitarca e de 64 anos para a menopausa. Quarenta e três casos foram classificados como ignorados no item idade na menarca, e 32 e 81 para menopausa e coitarca, respectivamente.

Os hábitos etílicos e tabagistas foram avaliados, e nessas análises foram encontradas 123 (99,2%) mulheres que se declararam como não usuárias de álcool e 106 (84,8%) que se declararam como não usuárias de tabaco. Somente se declararam como usuárias atuais de tabaco 10 (8,0%)

das mulheres e nenhuma se declarou como etilista atual. Quanto aos hábitos no passado 1 (0,8%) se declarou ex-etilista e 9 (7,2%) ex-tabagistas, porém não dispomos do tempo em que esses hábitos foram descontinuados.

Das mulheres incluídas nesse estudo 102 (94,4%) declararam nunca terem feito uso de anticoncepcional. Das mulheres que declararam ter feito uso desse tipo de medicamento todas o fizeram no passado (5,6%). Trinta e uma pacientes não responderam a essa questão ou a informação não foi possível de ser resgatada do prontuário médico de internação.

A avaliação do número de parceiros sexuais também foi exportada dos prontuários. Das pacientes do estudo 4 (6,2%) declararam que nunca possuíram nenhum parceiro sexual, 57 (87,7%) só tiveram um parceiro até o momento do diagnóstico, duas (3,1%) com dois parceiros sexuais e outras duas (3,1%) com quatro parceiros. Em mais da metade das mulheres esse dado foi ignorado.

Em relação ao número de gestações a variação encontrada no grupo analisado foi de 0 a 18. Dez (8,1%) delas não tiveram nenhuma gestação no período que precedeu o diagnóstico, 43 (34,7%) tiveram entre uma e quatro gestações, 48 (38,7%) entre cinco e dez e com mais de dez gestações foram 23 (18,5%). Ignorados compreenderam 10,8% do total.

Doze (9,4%) e 72 (58,1%) declararam nunca terem passado por partos e abortos, respectivamente. Quarenta e oito (37,8%) e 48 (38,7%) declararam terem, em algum momento, passado por entre 1 e 4 partos e abortos. Entre 5 a 10 partos e abortos declararam-se 52 (40,9%) e 3 (2,4%) respectivamente. Quinze (11,8%) tiveram mais de 10 partos e 1 (0,8%) mais

de dez abortos. Os dados ignorados compreenderam 12 e 15 dos dados relacionados ao número de partos e abortos respectivamente.

5.1.2 Dados Clínicos e de tratamento

O carcinoma vulvar é geralmente seguido de diversos sintomas conforme descrito na **Tabela 5**. Entre os mais comumente encontrados na amostra desse estudo estão o prurido (70,1%), a ulceração (53,3%), tumoração (39,4%) e sangramento (19,0%). Secreções, disúria e dores foram menos relatados com 10,2%, 4,4% e 7,3%, respectivamente. Em 2 das 139 pacientes avaliadas a informação não foi recuperada. A duração média e mediana dos sintomas, descrita na **Tabela 6**, foi de 11 e 6 meses, respectivamente. A variação no tempo do aparecimento do sintoma e o diagnóstico de carcinoma vulvar foi de meio mês à 120 meses.

Tabela 5 - Dados Clínicos referentes a 139 pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.

Dados clínicos	Número de pacientes	Porcentagem
Sintomas		
Ulceração	73	53,3
Tumoração	54	39,4
Prurido	96	70,1
Secreção	14	10,2
Sangramento	26	19,0
Disúria	6	4,4
Dor	10	7,3
Ignorado*	2	1,4
Tratamento Cirúrgico		
Não	0	0,0
Sim	139	100,0
Ignorado*	0	0
Quimioterapia adjuvante		
Não	125	94,7
Sim	7	5,3
Ignorado*	7	5,0
Radioterapia adjuvante		
Não	113	85,0
Sim	20	15,0
Ignorado*	6	4,3
Estadiamento FIGO (2009)		
IA	1	0,8
IB	76	58,9
II	8	6,2
IIIA	10	7,8
IIIB	25	19,4
IIIC	8	6,2
IVA	1	0,8
IVB	0	0
Ignorado*	10	7,2
Recidiva		
Não	78	60,9
Sim	49	38,3
Ignorado*	11	7,9
Padrão da recidiva		
Local	19	35,8
Linfonodal	12	22,6
À distância	5	9,4
Locorregional + distância	10	18,9
Ignorado*	93	66,9
Status no último segmento		
Viva sem câncer	57	41,3
Viva com câncer	10	7,2
Morte por câncer	46	33,3
Morte sem câncer	18	13,0
Morte sem especificação	7	5,1
Ignorado*	1	0,7

*Os casos ignorados foram calculados a partir do número total de pacientes incluídas, já os demais cálculos foram feitos subtraindo o número de casos ignorados.

Tabela 6 - Duração média, mediana e variação mínima e máxima do tempo de aparecimento dos sintomas ao diagnóstico de carcinoma vulvar.

Duração dos sintomas	
	Tempo em meses
Minimo	0,5
Máximo	120
Média	11
Mediana	6
Desvio Padrão	16,7

Em todos os 139 casos avaliáveis o tratamento escolhido foi o cirúrgico. Tratamento quimioterápico adjuvante foi administrado em 7 (5,3%) das pacientes e a radioterapia adjuvante foi realizada em 20 (15,0%). Em relação aos tratamentos adjuvantes a informação não foi possível de ser resgatada em 7 prontuários para a quimioterapia adjuvante e em 6 para a radioterapia adjuvante.

O estadiamento das pacientes com carcinoma vulvar é feito com base no preconizado pela Federação internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (**Anexo 1**). Seguindo tais especificações as pacientes foram distribuídas em: IA com uma paciente (0,8%), IB com 76 pacientes (58,9%), II com 8 (6,2%), IIIA com 10 (7,8%), IIIB com 25 (19,4%), IIIC com 8 (6,2%), IVA com 1 (0,8%) e IVB com nenhuma representante. Em dez pacientes a informação foi ignorada ou a classificação não correspondia à preconizada pela FIGO.

Recidivas foram encontradas em 49 (38,3%) dos casos de carcinoma vulvar. Entre as recidivas a local foi a mais presente naqueles casos em que a informação estava disponível no prontuário médico, com 19 (35,8%). Em

seguida vieram a recidiva linfonodal com 12 (22,6%), locorregional junto à distância com 10 (18,9%) e à distância com 5 (9,4%). No restante dos casos essa informação foi ignorada.

O *status* no último segmento da maioria das mulheres incluídas no estudo foi “viva sem câncer”, encontrado em 57 (41,3%). Em seguida a “morte por câncer” foi a mais freqüente com 46 (33,3%). Em menor frequência se seguiram “morte sem câncer” com 18 casos (13,0%), com 10 casos (7,2%) “viva com câncer” e com 7 (5,1%) “morte sem especificação”. Em um caso esse dado não estava disponível.

5.1.3 Dados Anátomo-patológicos

Todos os dados anátomo-patológicos avaliados estão descritos na **Tabela 7.**

Tabela 7 - Dados anátomo-patológicos referentes a 139 pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.

Dados anátomo-patológicos	Número de pacientes	Porcentagem
Tipo Histológico		
CEC 1**	46	33,1
CEC 2**	60	43,2
CEC 3**	13	9,4
Carcinoma basalóide	8	5,8
Carcinoma verrucoso	2	1,4
Carcinoma sarcomatóide	1	0,7
CEC + Carcinoma basalóide	3	2,2
CEC + Carcinoma Verrucoso	4	2,9
CEC + Carcinoma Sarcomatóide	1	0,7
Indeterminado	1	0,7
Invasão vascular		
Ausente	113	85,0
Presente	20	15,0
Ignorado*	6	4,3
Invasão perineural		
Ausente	117	89,3
Presente	14	10,7
Ignorado*	8	5,8
Metástase linfonodal		
Ausente	48	64,9
Presente	26	35,1
Ignorado*	65	46,8
Profundidade da invasão		
Derme superficial	16	11,7
Derme medial	67	48,9
Derme profunda	37	27,0
Subcutâneo	16	11,7
Derme superficial + subcutâneo	1	0,7
Ignorado*	2	1,4

*Os casos ignorados foram calculados a partir do número total de pacientes incluídas, já os demais cálculos foram feitos subtraindo o número de casos ignorados.

**CEC 1 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado; CEC 2 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado; CEC 3 – Carcinoma de células escamosas indiferenciado.

O tipo histológico é um fator muito relevante para a escolha da terapêutica e junto a outros fatores abaixo relatados, sugere um quadro mais ou menos agressivo da doença. Entre os tipos histológicos o mais comum entre as pacientes incluídas nesse estudo foi o CEC com 119 casos (85,7%), sendo 46 (33,1%) representados por CEC 1 (bem diferenciado), 60 (43,2%) por CEC 2 (moderadamente diferenciado) e 13 (9,4%) por CEC 3 (indiferenciado). Oito casos (5,8%) foram classificados como carcinomas basalóides, 2 (1,4%) como carcinomas verrucosos e um (0,7%) como carcinoma sarcomatóide. Em oito (5,8%) casos mais de um tipo histológico estava presente. Em um caso a classificação foi dada como indeterminada uma vez que não foi possível distinguir se o caso se tratava de um CEC 3 ou um carcinoma basalóide.

A ausência de invasão vascular e perineural foi observada em 113 (85,0%) e 117 (89,3%) casos, respectivamente. O número de casos ignorados para invasão vascular e perineural foi baixo, 6 e 8 respectivamente.

Em relação à metástase linfonodal a positividade encontrada foi de 35,1%. Nessa avaliação, 65 casos foram ignorados principalmente por falta de material disponível para avaliação.

Outro fator relevante para a avaliação do tumor é a profundidade da invasão, que nesse estudo foi estratificado em: derme superficial, derme medial, derme profunda, tecido subcutâneo e derme superficial junto à região subcutânea. No primeiro grupo foram 16 casos (11,7%), no segundo

67 (48,9%), no terceiro 37 (27,0%), no quarto 16 (11,7%) e no quinto 1 (0,7%). Em dois casos esse dado não foi avaliável.

5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

A **Tabela 8** demonstra os resultados obtidos para todos os marcadores avaliados.

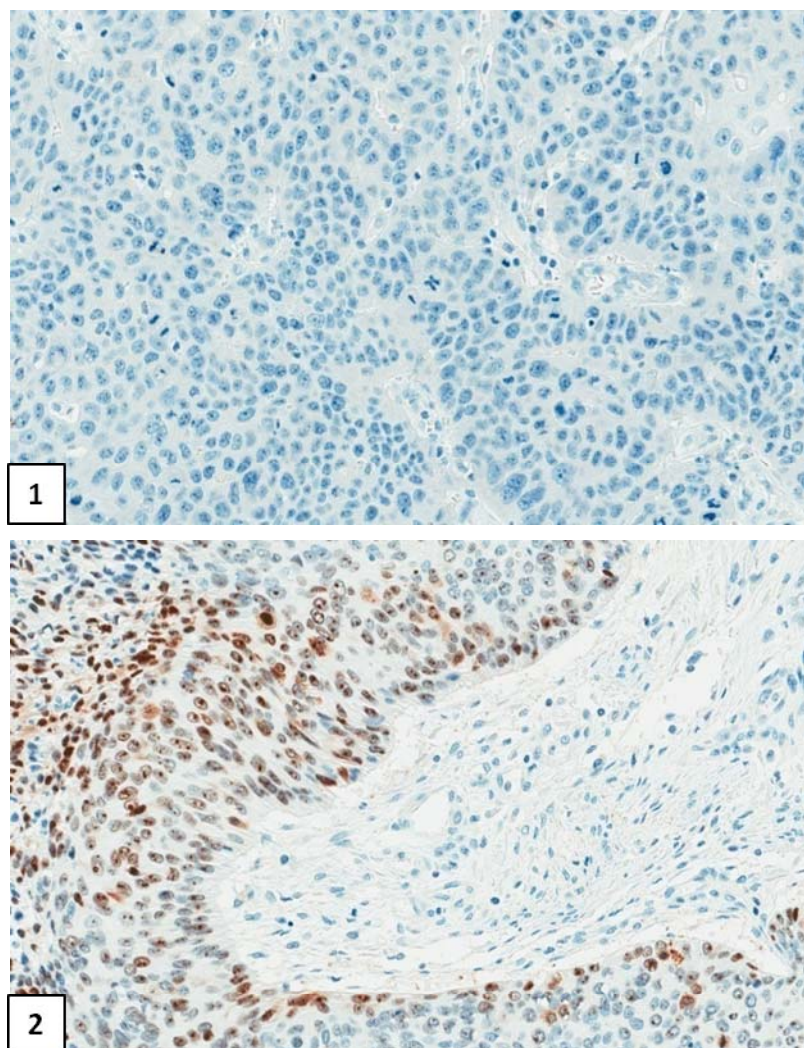
Tabela 8 - Avaliação IHQ dos marcadores p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb, PTEN e BRCA1 em carcinomas vulvares invasivos de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo.

Marcadores	Marcação IHQ						
					Forte		Não
	Negativos		Fraco Positivos		Positivos		avaliáveis
	n	%	n	%	n	%	
p14*	97	83,6			19	16,4	23
p16	96	70,6	14	10,3	26	19,1	3
p21	97	73,5	33	25,0	2	1,5	7
p27	106	79,1	22	16,4	6	4,5	5
p53	63	47,0	33	24,6	38	28,4	5
p63	60	49,6	61	50,4	0	0,0	18
p73	31	32,0	22	22,7	44	45,4	42
pRb	112	85,5	15	11,5	4	3,1	8
PTEN	104	86,0	17	14,0	0	0,0	18
BRCA1	6	6,2	36	37,1	55	56,7	42

*Os valores incluídos na coluna “Forte Positivos” corresponde à totalidade dos casos positivos

5.2.1 p14

A proteína p14 apresentou marcação nucleolar heterogênea nos tecidos tumorais vulvares avaliados e foi classificada em dois grupos (negativo e positivo), de acordo com a análise visual realizada. Dos 139 casos avaliados em duplicata, 23 não foram avaliáveis por falta de material no TMA ou falta de tumor suficiente na área marcada. Dezenove casos (16,4%) foram classificados como positivos e o restante como negativos, compreendendo 83,6% (**Figura 1**).



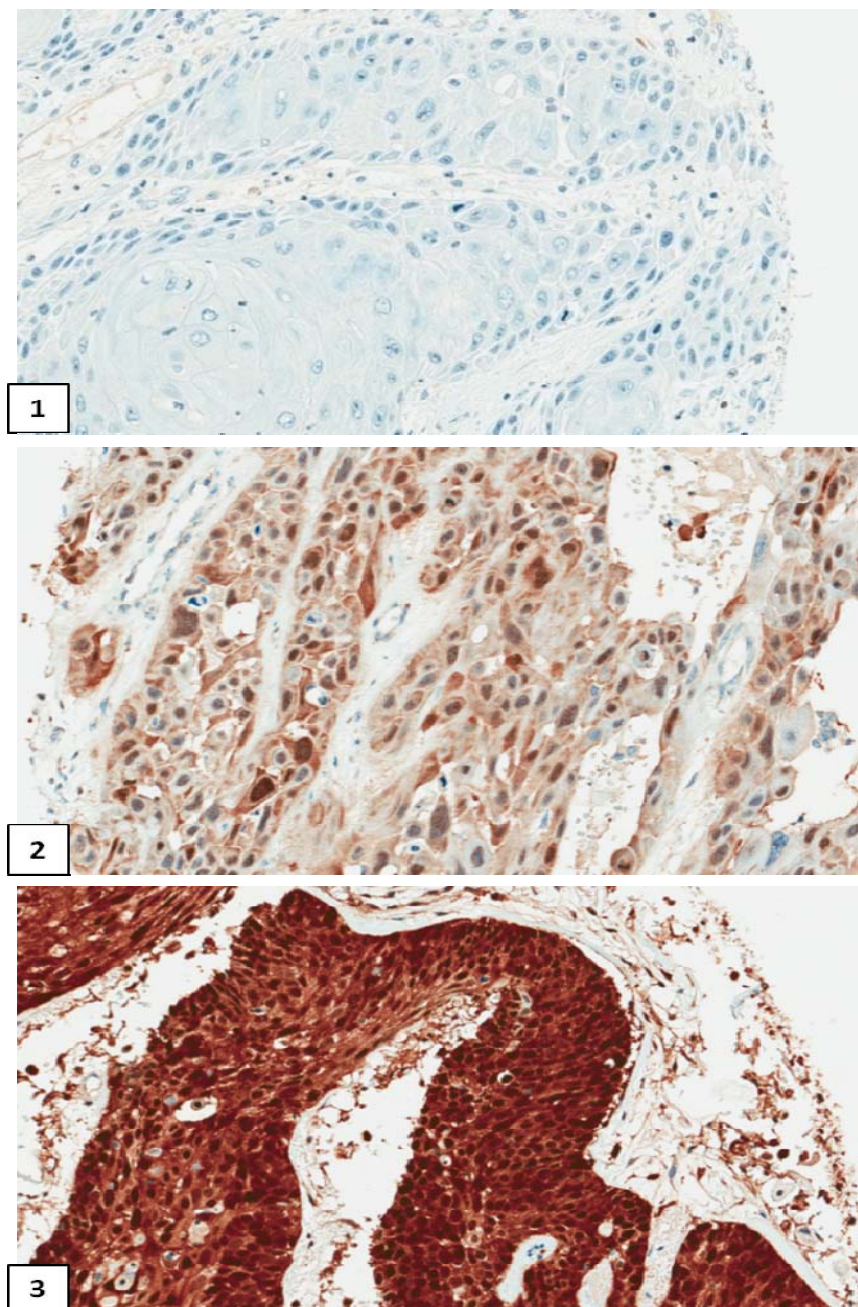
*1 - p14 negativo; 2- p14 positivo

Figura 1 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p14 (aumento 10x).

5.2.2 p16

A proteína p16 foi classificada em três grupos: negativo, fraco positivo e forte positivo, obtendo como resultado 96 (70,6%), 14 (10,3%) e 26 (19,1%), respectivamente. Pelos mesmos motivos já citados em p14 3 amostras não foram passíveis de avaliação para p16. Essa proteína também apresentou marcação citoplasmática que, apesar de ter sido avaliada

visualmente não foi descrita nesse trabalho pela ausência de trabalhos relevantes que avaliaram esse tipo de marcação em carcinomas vulvares (Figura 2).

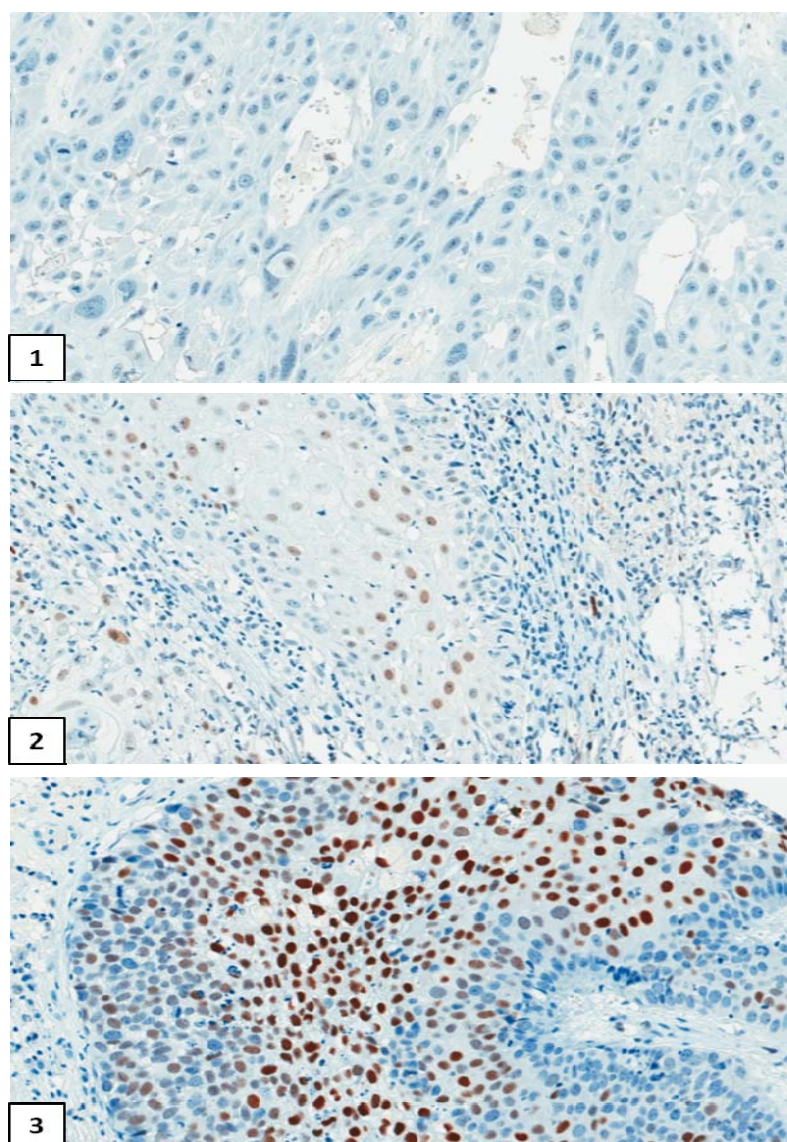


*1 – p16 negativo; 2- p16 fraco positivo; 3 – p16 forte positivo

Figura 2 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p16 (aumento 10x).

5.2.3 p21

A proteína p21 foi encontrada com forte expressão em somente 1,5% dos casos, em 33 casos (25,0%) a expressão foi considerada como fraco positivo e a maioria dos casos, 97 (73,5%), foram classificados como negativos. Outros 7 casos foram perdidos ou não passíveis de avaliação (Figura 3).

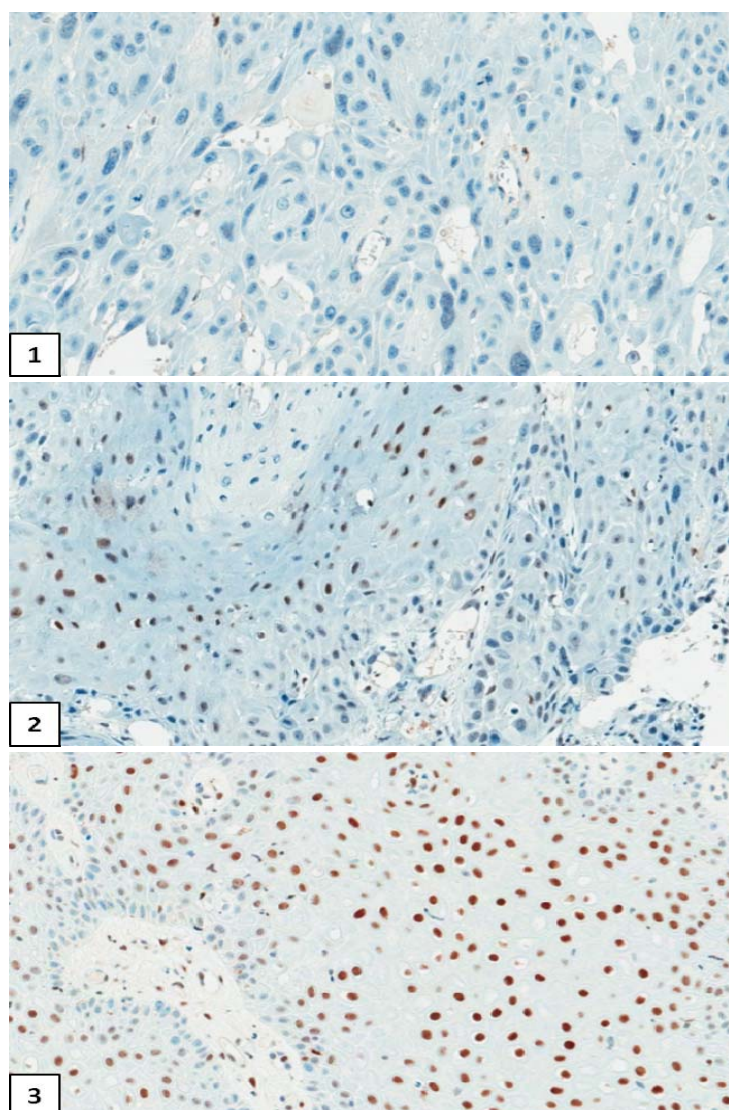


*1 – p21 negativo; 2- p21 fraco positivo; 3 – p21 forte positivo

Figura 3 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p21 (aumento 10x).

5.2.4 p27

Como visto em p21, a supressora p27 obteve resultados principalmente negativos (79,1%). Os demais casos foram classificados como fraco positivos, correspondendo a 22 (16,4%) e somente 6 (4,5%) foram classificados como forte positivos. Não avaliáveis representaram 3,6% do total (**Figura 4**).

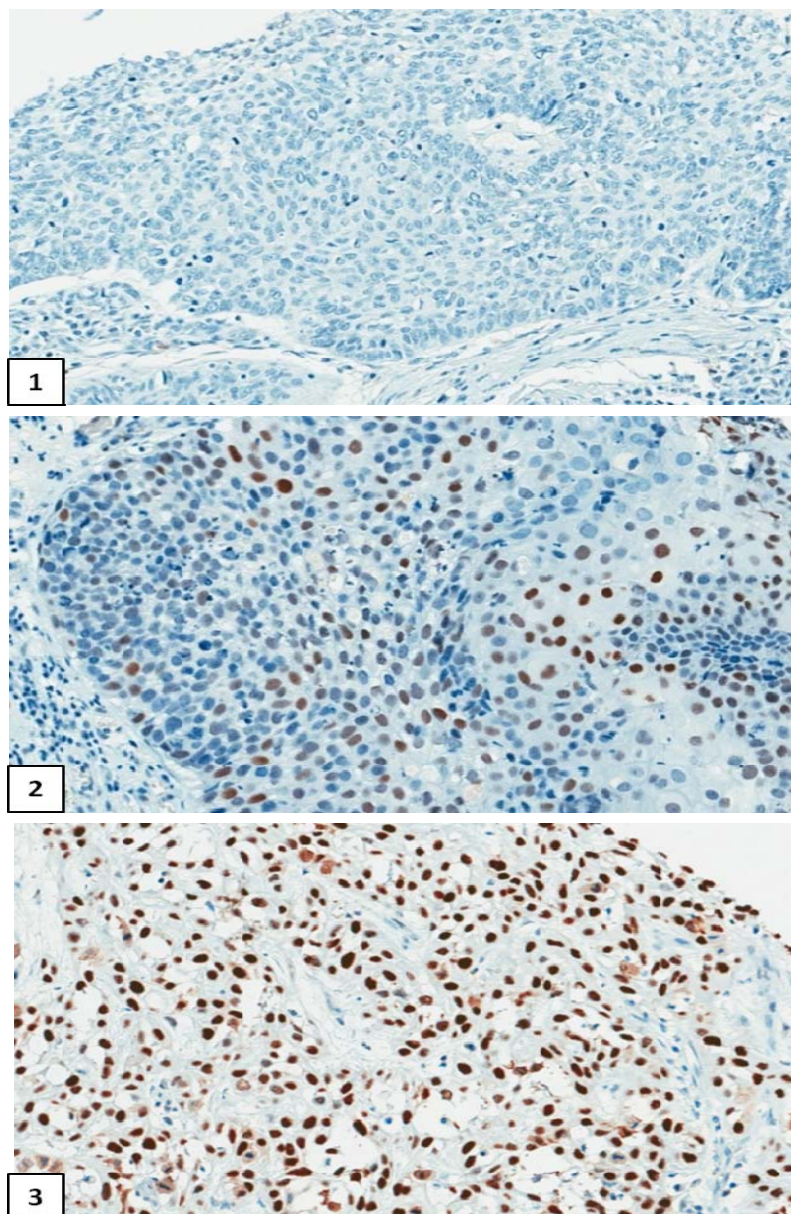


*1 – p27 negativo; 2- p27 fraco positivo; 3 – p27 forte positivo

Figura 4 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p27 (aumento 10x).

5.2.5 p53

Classificada em três grupos a proteína p53 apresentou os seguintes resultados: 63 (47%) negativos, 33 (24,6%) fraco positivos e 38 (28,4%) de forte positivos (**Figura 5**). Cinco casos foram ignorados pelos motivos já descritos acima.

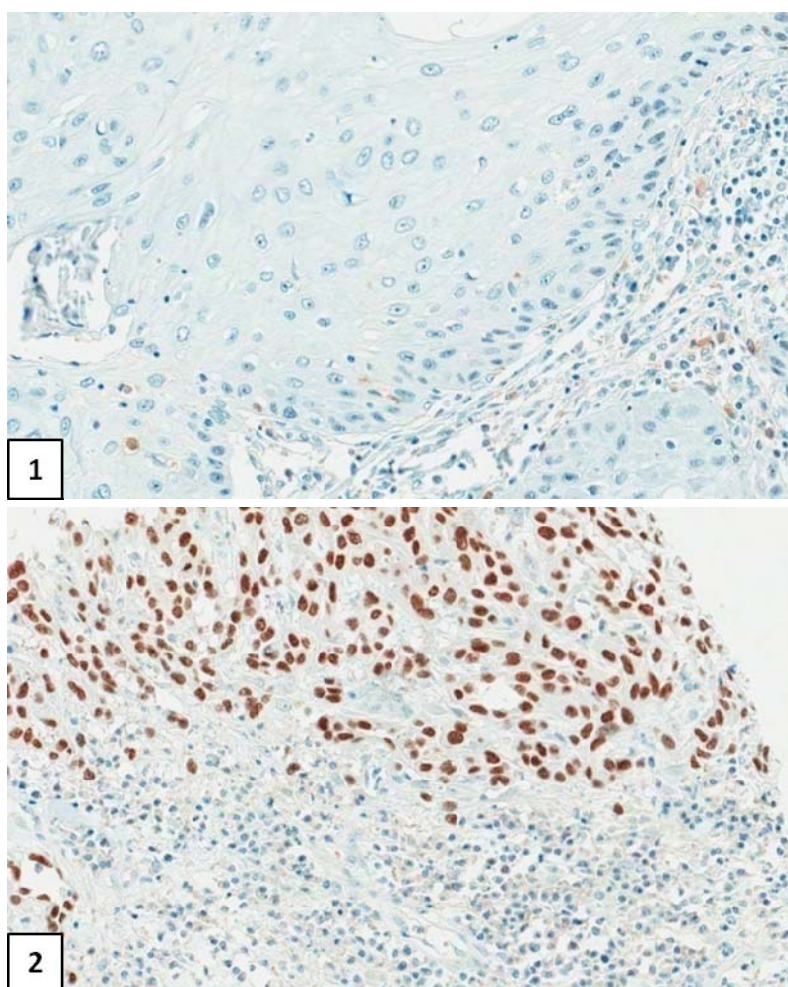


*1 – p53 negativo; 2- p53 fraco positivo; 3 – p53 forte positivo

Figura 5 – Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p53 (aumento 10x).

5.2.6 p63

Dezoito casos foram excluídos por falta de material avaliável no TMA. Dos casos restantes nenhum foi considerado como forte positivo para p63, 60 (49,6%) foram considerados negativos e 61 (50,4%) foram considerados positivos (**Figura 6**).

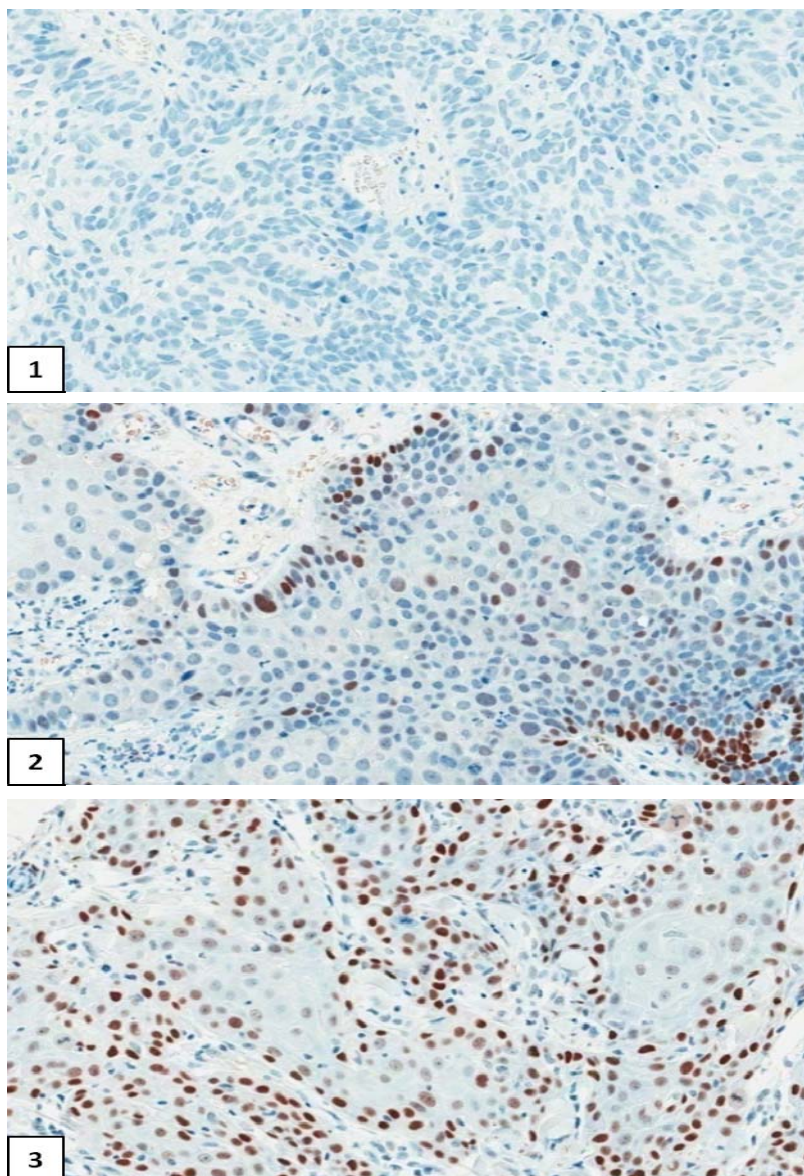


*1 – p63 negativo; 2- p63 positivo

Figura 6 – Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p63 (aumento 10x).

5.2.7 p73

A marcação para p73 demonstrou uma distribuição homogênea entre os grupos quando comparada aos outros marcadores da família do p53. Foram classificados como negativos 31 (32%) dos casos, como fraco positivos 22 (22,7%) e como forte positivos 44 (45,4%). **(Figura 7).**

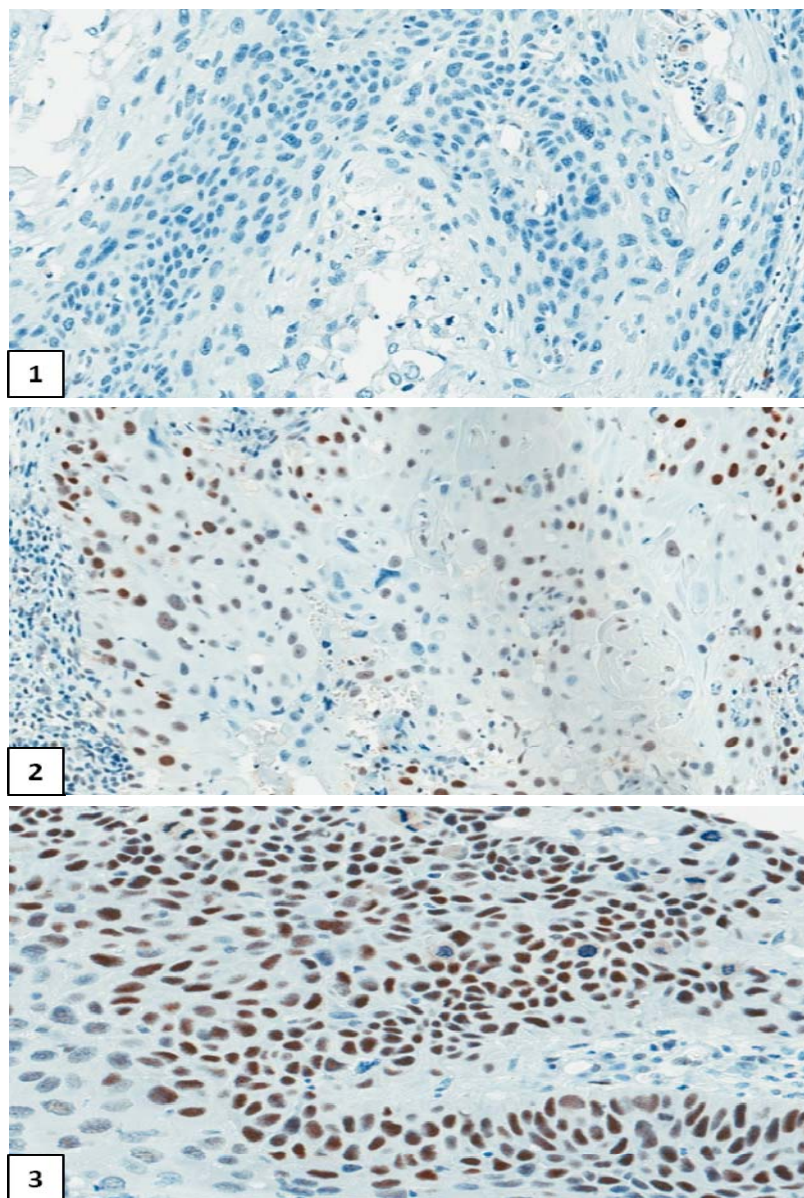


*1 – p73 negativo; 2- p73 fraco positivo; 3 – p73 forte positivo

Figura 7 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de p73 (aumento 10x).

5.2.8 pRb

Cento e trinta e um casos foram avaliados em relação à expressão de pRb, os demais 8 casos não foram avaliáveis. Entre os avaliáveis 112 (85,5%) foram negativos, 15 (11,5%) fraco positivos e 4 (3,1) foram considerados forte positivos (**Figura 8**).

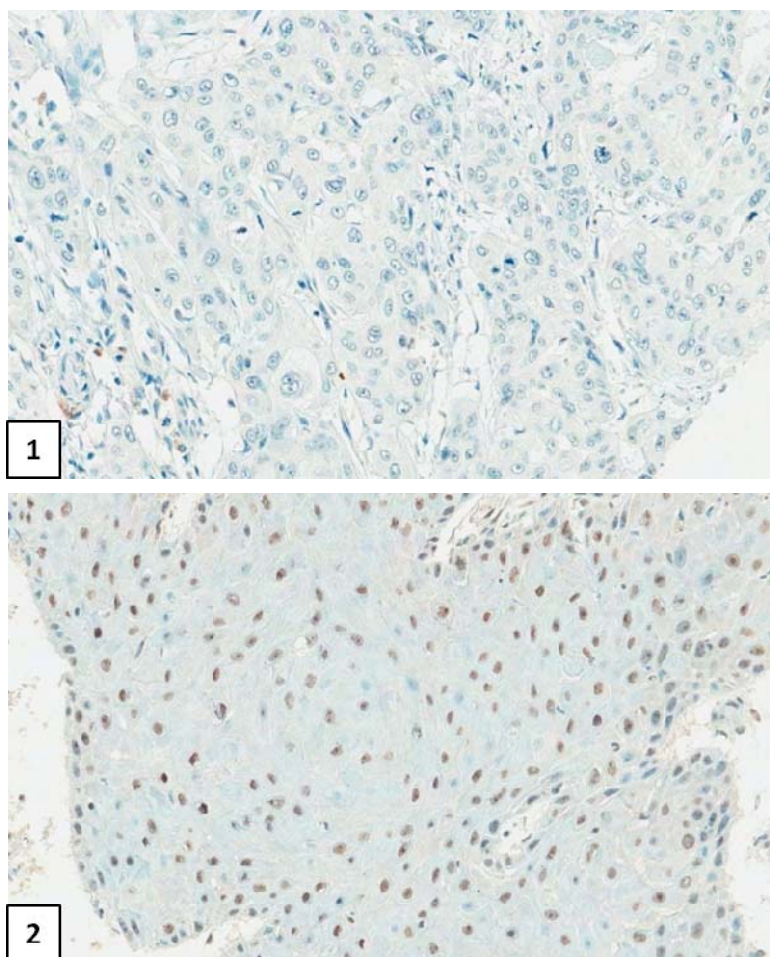


*1 – pRb negativo; 2- pRb baixo positivo; 3 – pRb forte positivo

Figura 8 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de pRb (aumento 10x).

5.2.9 PTEN

A expressão protéica de PTEN demonstrou fraca positividade ou nenhuma em todos os casos avaliáveis. Os casos negativos para a expressão da proteína em questão representaram 86% do total e somente 17 (14,0%) foram considerados como fraco positivos. Dezoito casos foram excluídos por problemas na técnica ou ausência de material na área para avaliação (**Figura 9**).

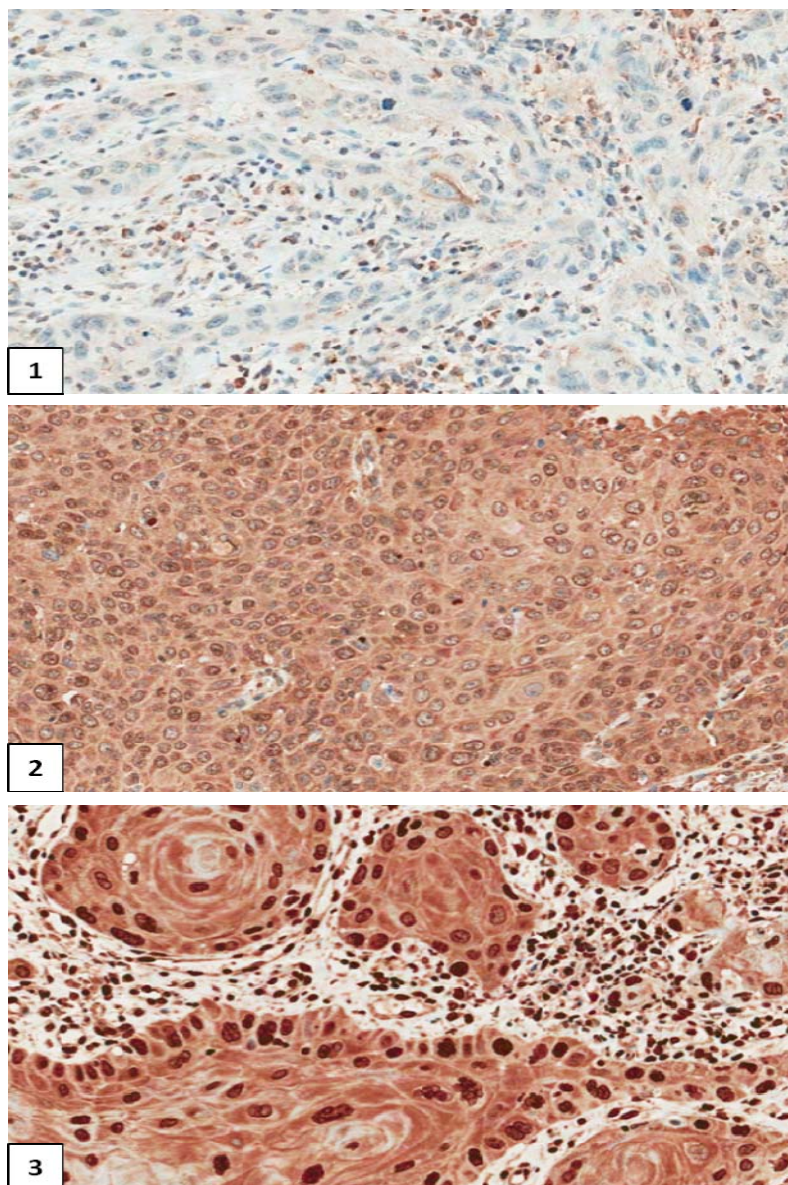


*1 – PTEN negativo; 2- PTEN baixo positivo

Figura 9 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de PTEN (aumento 10x).

5.2.10 BRCA1

Os carcinomas vulvares avaliados apresentaram uma grande proporção de casos fraco e forte positivos para BRCA1 sendo 36 casos (37,1%) e 55 (56,7%), respectivamente. Somente 6 (6,2%) dos casos avaliados foram classificados como negativos. **(Figura 10).**



*1 – BRCA1 negativo; 2- BRCA1 fraco positivo; 3 – BRCA1 forte positivo

Figura 10 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à análise IHQ para a avaliação da expressão de BRCA1 (aumento 10x).

5.3 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

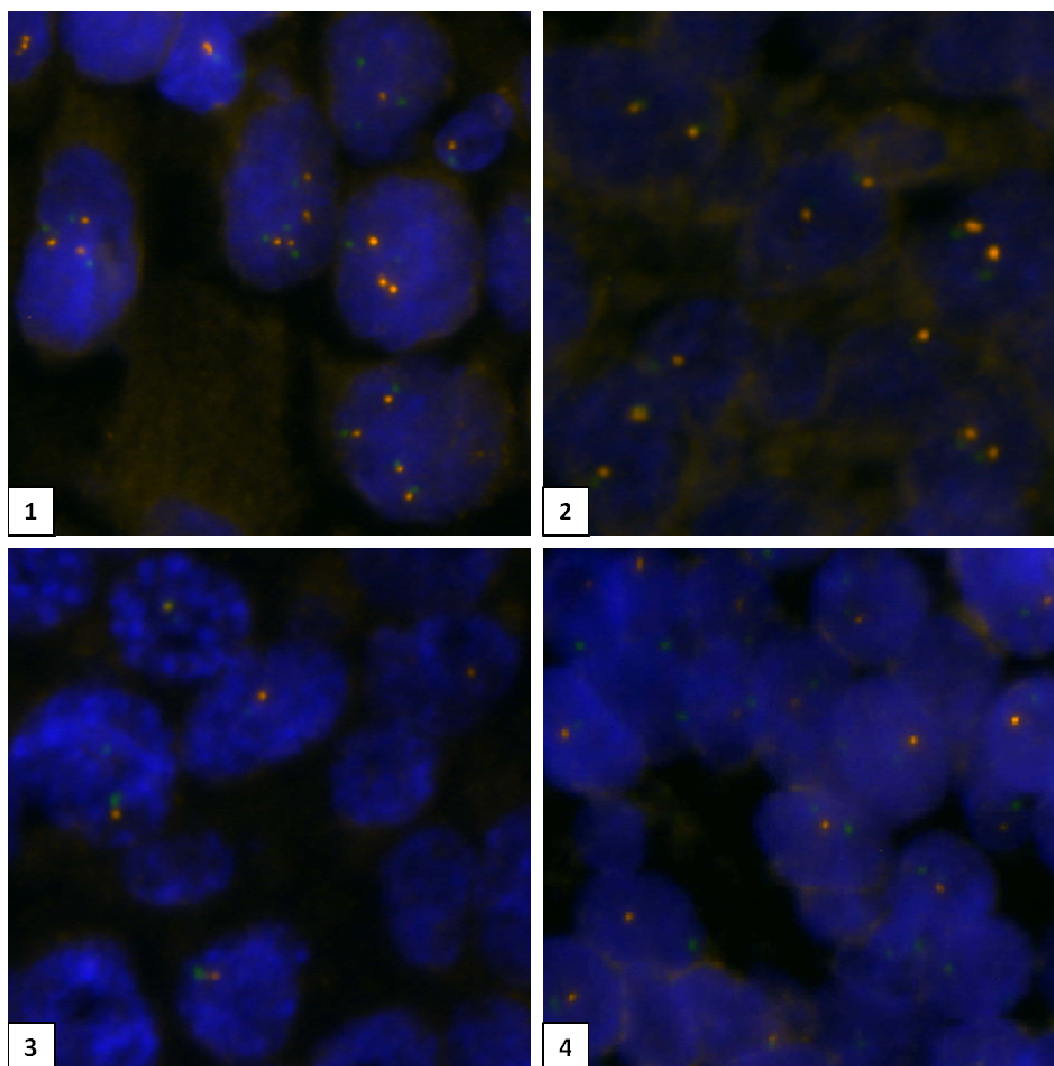
Os resultados obtidos a partir das reações de FISH e a comparação da expressão protéica estão descritos na **Tabela 9**. Não foi possível estabelecer relação estatisticamente significativa entre a expressão protéica e o *status* gênico de *TP53* e *PTEN*.

Tabela 9 - Avaliação dos genes *TP53* e *PTEN* por FISH e comparação com os resultados obtidos por IHQ, em carcinomas vulvares invasivos de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo.

Status	n (<i>PTEN</i>)	IHQ (<i>PTEN</i>)		n (<i>TP53</i>)	IHQ (<i>p53</i>)	
		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo
Polissomia	11 (16,4)	10 (90,9)	1 (9,1)	12 (18,8)	7 (58,3)	5 (41,7)
Dissomia	43 (64,2)	38 (88,4)	5 (11,6)	42 (65,6)	25 (59,5)	17 (40,5)
Monossomia	11 (16,4)	10 (90,9)	1 (9,1)	6 (9,4)	3 (50)	3 (50)
Deleção	2 (3)	2 (100)	0 (0)	4 (6,3)	1 (25)	3 (75)
TOTAL	67	60(89,6)	7(10,4)	64	36(56,3)	28(43,7)

5.3.1 *TP53*

A reação de hibridação *in situ* fluorescente foi avaliável em 64 casos obtendo como resultados: 6 (9,1%) casos de monossomia, 0 de amplificação, 13 (19,7%) de polissomia, 43 (65,2%) de dissomia e 4 (6,1%) de deleção. Do total de 139 casos somente 66 foram avaliáveis, nos demais não houve hibridação ou a área tumoral foi perdida durante a reação (**Figura 11**).



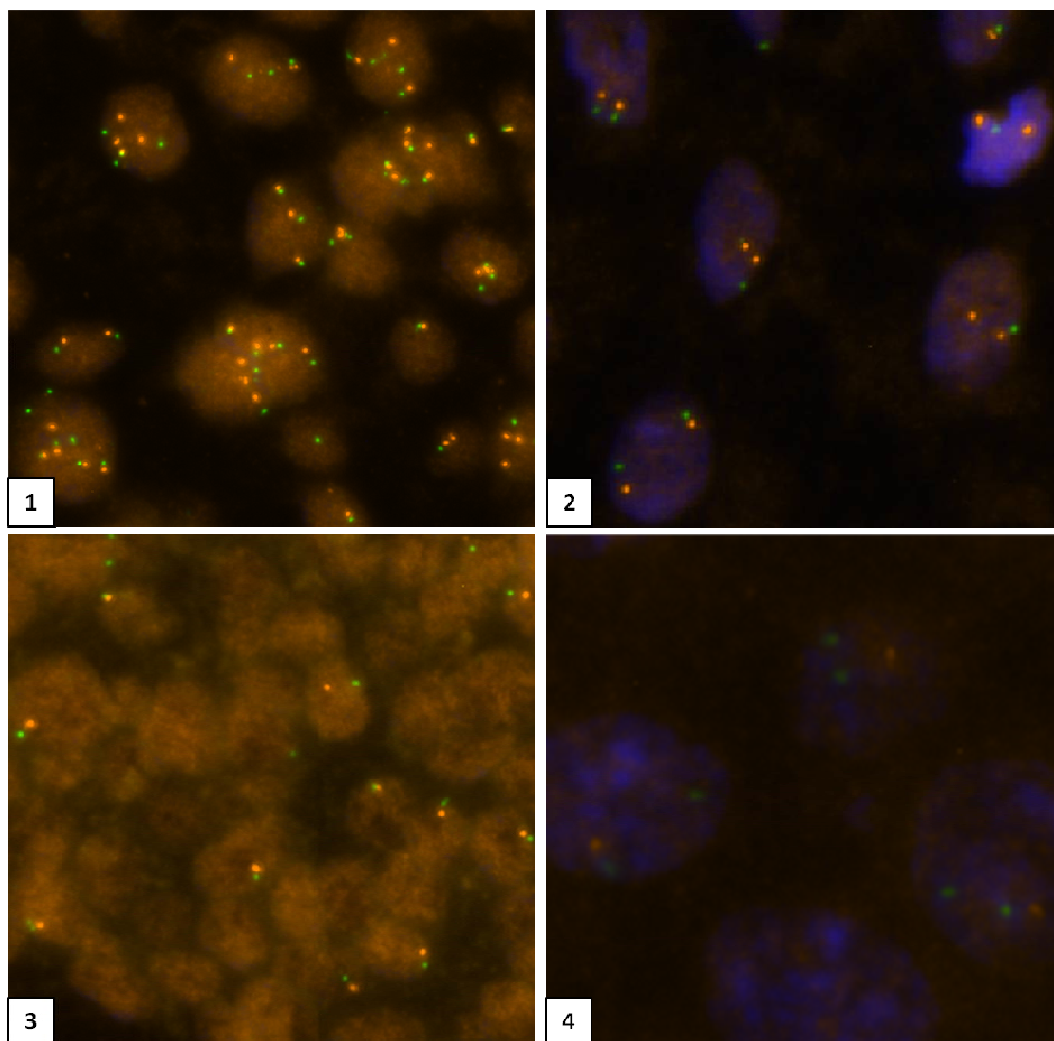
*1 – Polissomia; 2- Dissomia; 3 – Monossomia; 4- Deleção

Figura 11 - Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à técnica de FISH para a avaliação do *status* gênico de *TP53*.

5.3.2 *PTEN*

O *status* gênico de *PTEN* foi avaliado utilizando o mesmo protocolo padronizado para *TP53* com os seguintes resultados: nenhum caso de amplificação, 12 (16,4%) casos de monossomia, 9 (12,3%) de polissomia, 50 (69,5%) de dissomia e 2 (2,7%) casos de deleção. Sessenta e seis dos

cento e trinta e nove casos não foram avaliáveis pelos mesmos motivos descritos anteriormente (**Figura 12**).



*1 – Polissomia; 2- Dissomia; 3 – Monossomia; 4- Deleção

Figura 12 – Imagem obtida de corte histológico de carcinoma vulvar de pacientes provenientes do Hospital A.C. Camargo, submetido à técnica de FISH para a avaliação do *status* gênico de *PTEN*.

5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

As reações de qRT-PCR para a avaliação dos transcritos dos genes *CDKN2A(p16)*, *CDKN1A*, *TP53*, *TP63*, *TP73*, *CDKN2A(p14)*, *RB*, *PTEN* e *BRCA1* obtiveram resultados significativos, com valor de $p < 0,05$ nas avaliações de *CDKN2A(p14)* ($p < 0,001$), *CDKN2A(p16)* ($p = 0,02$) e *TP73* ($p = 0,011$) que foram encontrados mais expressos nas amostras tumorais e *CDKN1A* ($p = 0,002$), *TP53* ($< 0,001$) e *PTEN* ($p < 0,001$) que foram encontrados mais expressos em tecido normal (**Figura 13**). Nessa figura estão dispostas cada uma das amostras representadas como pontos de acordo com a expressão de cada um dos genes. Os genes *RB* e *BRCA1* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre a expressão nos tecidos normais e tumorais, $p = 0,38$ e $p = 0,53$, respectivamente (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Avaliação da expressão dos genes *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)*, *TP73*, *CDKN1A*, *TP53*, *PTEN*, *RB* e *BRCA1* em amostras normais e tumorais vulvares de pacientes operadas no Hospital A.C. Camargo.

Marcador	tecido	n	média de Δ CTs	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo	p
p14	N	16	12.84	20.02	1.73	5.38	82.35	<0.001
	T	16	102.65	83.04	4.14	90.59	332.97	
p16	N	16	29.25	84.37	0.85	4.83	343.90	0.02
	T	16	384.37	472.06	0.21	264.80	1493.10	
p21	N	16	2.87	1.96	1.13	2.29	8.43	0.002
	T	16	1.28	0.71	0.29	1.19	2.49	
p53	N	16	0.93	0.38	0.21	0.97	1.49	<0.001
	T	14	0.36	0.23	0.05	0.30	0.86	
p73	N	16	3.26	4.91	0.39	1.27	24.47	0.011
	T	14	4.90	5.11	1.64	3.44	23.27	
pRb	N	16	1.03	0.40	0.50	0.97	2.14	0.38
	T	16	0.90	0.44	0.28	0.90	1.75	
PTEN	N	16	9.54	9.30	3.89	7.98	43.85	<0.0001
	T	16	2.01	2.34	0.38	1.33	9.98	
BRCA1	N	16	0.81	0.19	0.50	0.77	1.15	0.53
	T	16	0.77	0.46	0.20	0.69	2.21	

N = tecido vulvar normal

T = tecido vulvar tumoral

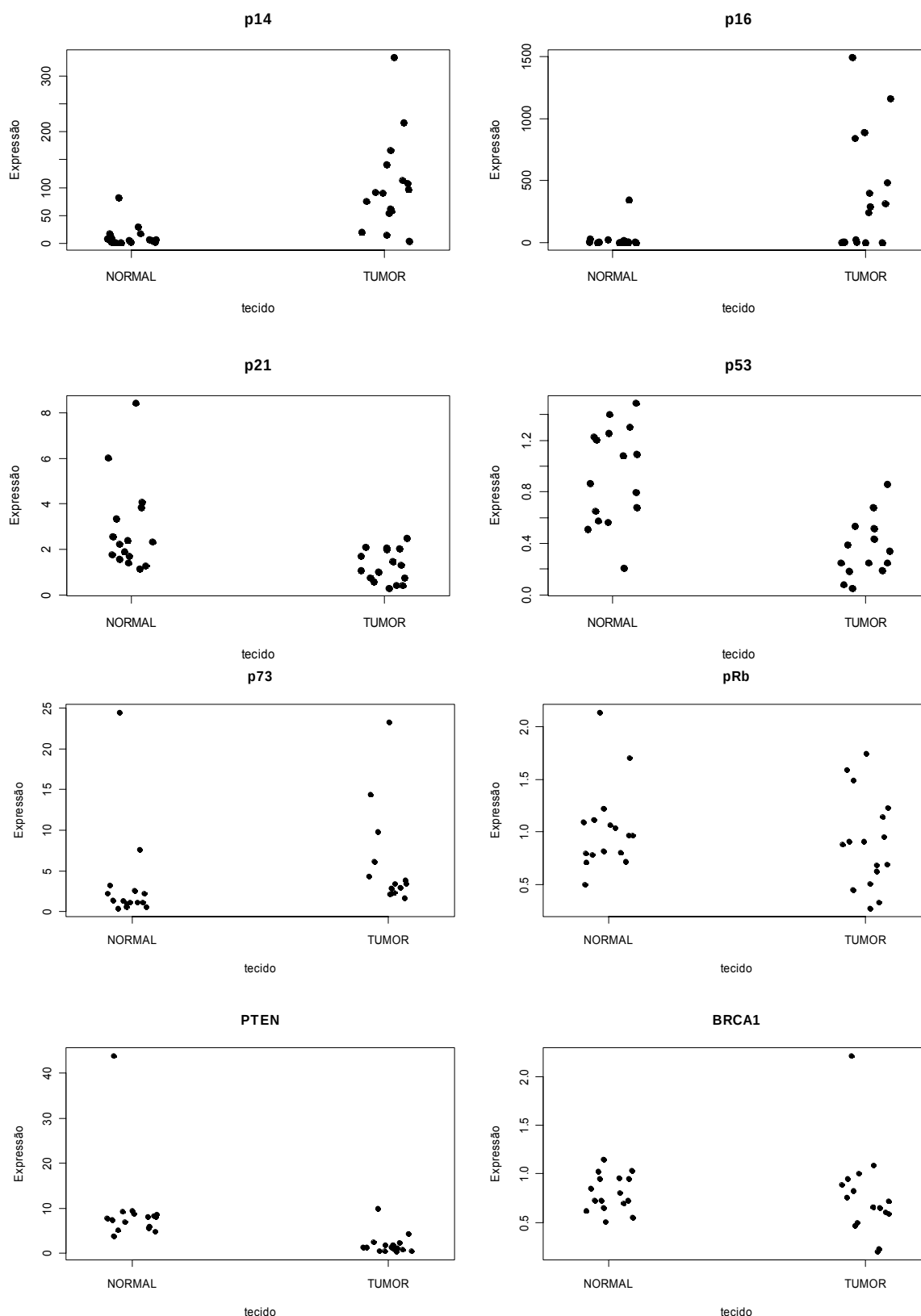


Figura 13 - Relação entre a expressão dos genes *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)*, *TP73*, *CDKN1A*, *TP53*, *PTEN*, *RB* e *BRCA1* em amostras normais e tumorais vulvares de pacientes operadas no hospital A.C. Camargo.

As reações de IHQ não foram capazes de demonstrar nenhuma relação estatística com a avaliação por qRT-PCR uma vez que o número de casos avaliados foi muito pequeno (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Avaliação da expressão dos genes *CDKN2A(p14)*, *CDKN2A(p16)*, *TP73*, *CDKN1A*, *TP53*, *PTEN*, *RB* e *BRCA1* e comparação com a expressão proteica.

Marcador	IHQ	n	qRT-PCR				
			desvio		mínimo	máximo	mediana
			média	padrão			
p14	negativo	8	119.07	98.18	4.14	332.97	99.45
	positivo	4	87.30	41.05	53.59	141.65	75.98
p16	negativo	9	342.01	515.88	0.21	1493.10	24.75
	positivo	4	254.02	199.58	0.32	485.16	264.80
p21	negativo	6	1.18	0.56	0.43	2.04	1.19
	positivo	8	1.37	0.81	0.29	2.49	1.37
p53	negativo	6	0.22	0.17	0.05	0.54	0.19
	positivo	6	0.44	0.23	0.25	0.86	0.39
p73	negativo	2	2.89	0.06	2.85	2.93	2.89
	positivo	8	5.23	7.35	1.64	23.27	3.44
pRb	negativo	11	0.82	0.42	0.28	1.75	0.88
	positivo	3	1.08	0.54	0.51	1.59	1.15
PTEN	negativo	12	1.42	1.06	0.38	4.28	1.25
	positivo	1	1.93	-	1.93	1.93	1.93
BRCA1	negativo	2	0.80	0.12	0.72	0.89	0.80
	positivo	11	0.72	0.54	0.20	2.21	0.61

5.5 PAPILOMAVÍRUS HUMANO – HPV

A infecção por HPV foi avaliada em 105 casos (**Tabela 12**), e destes 43 (41%) foram considerados como infectados pelo vírus. Os 34 casos sem resultados para HPV somente dispunham de material emblocado em parafina e, neles o DNA extraído não alcançou o nível de integridade necessária para a realização da técnica.

Tabela 12 – Porcentagem de infecção por HPV e tipo viral infectante nos carcinomas vulvares provenientes de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

HPV	n	%
negativo	62	59
positivo	43	41
16	13	30
18	2	5
33	5	12
35	1	2
42	1	2
45	1	2
53	4	9
54	1	2
67	2	5
69	1	2
71	2	5
16+33	2	5
42+54	1	2
16+33+84	1	2
18+33+35	1	2
33+18+16	1	2
33+31+82	1	2
33+35+16	1	2
Ignorados	2	5

Entre os carcinomas vulvares HPV positivos a infecção por apenas um tipo viral foi observada em 33 (76,7%) dos casos. Destes, o HPV16 foi o mais prevalente, seguido pelo HPV33, tendo sido observados em 13 e 5 casos, respectivamente. Entre aqueles casos que demonstraram co-infecção por mais de um tipo viral não foi observada nenhuma combinação viral que se sobrepusesse às demais de forma relevante, contudo os tipos HPV16 e HPV33 foram encontrados em 62,5% e em 87,5% das co-infecções, respectivamente.

Os dados referentes à infecção pelo HPV foram relacionados às seguintes variáveis clínicas, anátomo-patológicas e demográficas: profundidade da invasão, infiltrado inflamatório, invasão vascular, invasão perineural, metástase linfonodal, lesões associadas, estadiamento FIGO, escolaridade e estado civil. Os resultados obtidos a partir dessa análise estão contidos na **Tabela 13**. Em nenhuma delas foi encontrada relação estatisticamente significativa com $p \leq 0,04$. O grau histológico não foi passível de realização de teste estatístico, devido a sua estratificação.

Tabela 13 - Associação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas com a infecção por HPV nos carcinomas vulvares provenientes de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	HPV		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	31 (52)	26 (62)	57	0.31
	derme profunda	29 (48)	16 (38)	45	
Infiltrado inflamatório	leve	17 (29)	11 (26)	28	0.91
	moderado	36 (61)	28 (65)	64	
	intenso	6 (10)	4 (9)	10	
Invasão Vascular	não	48 (80)	34 (85)	82	0.52
	sim	12 (20)	6 (15)	18	
Invasão Perineural	não	49 (84)	36 (90)	85	0.43
	sim	9 (16)	4 (10)	13	
Metástase linfonodal	não	19 (59)	18 (69)	37	0.44
	sim	13 (41)	8 (31)	21	
Lesões Associadas	não	46 (81)	28 (68)	74	0.16
	sim	11 (19)	13 (32)	24	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	37 (61)	28 (67)	65	0.53
	III ou IV	24 (39)	14 (33)	38	
Escolaridade	analfabeto ou 1º grau	40 (75)	30 (77)	70	0.87
	>= 2º grau	13 (25)	9 (23)	22	
Estado Civil	casadas/viúva/separadas			50	0.31
	s	32 (54)	18 (44)		
	solteiras	27 (46)	23 (56)	50	

Os dados referentes à infecção por HPV também foram relacionados à expressão protéica dos supressores tumorais avaliados no presente estudo e estão descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Associação entre a expressão das proteínas supressoras de tumor p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb, PTEN, e BRCA1 com a infecção por HPV nos carcinomas vulvares provenientes do Hospital A.C. Camargo.

Marcador	categoria	HPV		Total	p
		Negativo	Positivo		
p14	negativo	40 (83)	32 (84)	72	0.91
	positivo*	8 (17)	6 (16)	14	
p16	negativo	48 (79)	26 (62)	74	0.06
	positivo*	13 (21)	16 (38)	29	
p21	negativo	46 (77)	28 (68)	74	0.35
	positivo*	14 (23)	13 (32)	27	
p27	negativo	47 (80)	33 (79)	80	0.89
	positivo*	12 (20)	9 (21)	21	
p53	negativo	28 (47)	26 (62)	54	0.15
	positivo*	31 (53)	16 (38)	47	
p63	negativo	27 (52)	18 (47)	45	0.67
	positivo*	25 (48)	20 (53)	45	
pRb	negativo	47 (82)	37 (88)	84	0.44
	positivo*	10 (18)	5 (12)	15	
p73	negativo	17 (41)	9 (31)	26	0.37
	positivo*	24 (59)	20 (69)	44	

*Positivo=forte ou fraco positivo

As proteínas p14, p21, p27, p53, p63, p73 e pRb não apresentaram diferenças significativas de expressão entre os casos HPV positivos e negativos, permanecendo praticamente iguais os grupos com e sem expressão entre os casos HPV positivos e negativos. A relevância estatística não alcançou valor de p menor que 0,1 nesses casos, e chegou a 0,91 na avaliação de p14.

A proteína p16 apresentou uma tendência de maior expressão nos casos HPV positivos quando comparados aos casos HPV negativos ($p=0,06$).

5.6 VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANÁTOMO-PATOLÓGICAS X EXPRESSÃO PROTÉICA

A expressão protéica dos supressores tumorais p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb e PTEN foi avaliada em 139 carcinomas vulvares invasivos e correlacionada às variáveis clínicas e anátomopatológicas bem como em relação à Sobrevida Livre de Doença (SLD) e Sobrevida Câncer Específica (SCE) (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Relação entre a SCE e SLD com a expressão IHQ de p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73, pRb e PTEN.

Marcador	categoria	n	SCE	p	n	SLD	p
p14	negativo	96	1	0.04	87	1	0.02
	positivo	19	2.04		16	2.25	
p16	positivo	40	1	0.37	38	1	0.69
	negativo	95	1.33		84	1.14	
p21	negativo	96	1	0.96	86	1	0.5
	positivo	35	0.98		32	1.25	
p27	negativo	105	1	0.39	98	1	0.21
	positivo	28	1.34		22	1.54	
p53	negativo	66	1	0.74	61	1	0.49
	positivo	71	1.10		63	1.22	
p63	positivo	19	1	0.2	19	1	0.19
	negativo	111	2.13		99	1.96	
pRb	positivo	17	1	0.4	15	1	0.35
	negativo	120	1.56		109	1.61	
PTEN	negativo	31	1	0.85	27	1	0.37
	positivo	65	1.07		60	1.41	
p73	positivo	61	1	0.45	56	1	0,82
	negativo	59	1.27		54	1.08	

5.6.1 p14

A expressão de p14 revelou relação significativa com a invasão vascular, estando mais presente naqueles casos onde a invasão dos vasos por células tumorais estava presente ($p=0,05$). O mesmo, apesar de não alcançar significância estatística, foi observado para a invasão perineural e metástase linfonodal com valores de $p=0,39$ e $0,25$, respectivamente. Uma tendência contrária foi observada na relação entre a expressão protéica e as lesões associadas, nessa análise os casos com marcação para p14

apresentaram menos lesões associadas ao carcinoma vulvar invasivo ($p=0,12$). A expressão de p14 não sofreu grandes alterações quando associada à profundidade de invasão, ao estadiamento FIGO e ao infiltrado inflamatório ($p=0,54$, $p=0,44$ e $p=0,98$) (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Associação entre a expressão IHQ de p14 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p14		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	62 (65)	11 (58)	73	0.54
	derme profunda	33 (35)	8 (42)	41	
Infiltrado inflamatório	leve	25 (27)	5 (26)	30	0.98
	moderado	58 (62)	12 (63)	70	
	intenso	11 (12)	2 (11)	13	
Invasão Vascular	não	85 (92)	14 (74)	99	0.05
	sim	7 (8)	5 (26)	12	
Invasão Perineural	não	84 (93)	16 (84)	100	0.39
	sim	6 (7)	3 (16)	9	
Metástase linfonodal	não	36 (71)	4 (44)	40	0.25
	sim	15 (29)	5 (56)	20	
Lesões Associadas	não	60 (67)	14 (82)	74	0.20
	sim	30 (33)	3 (18)	33	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	59 (63)	13 (72)	72	0.44
	III ou IV	35 (37)	5 (28)	40	

Os cálculos de sobrevida demonstraram que a expressão de p14 está relacionada a uma menor sobrevida câncer específica ($p=0,04$) e a sobrevida livre de doença ($p=0,02$) (**Figura 14**).

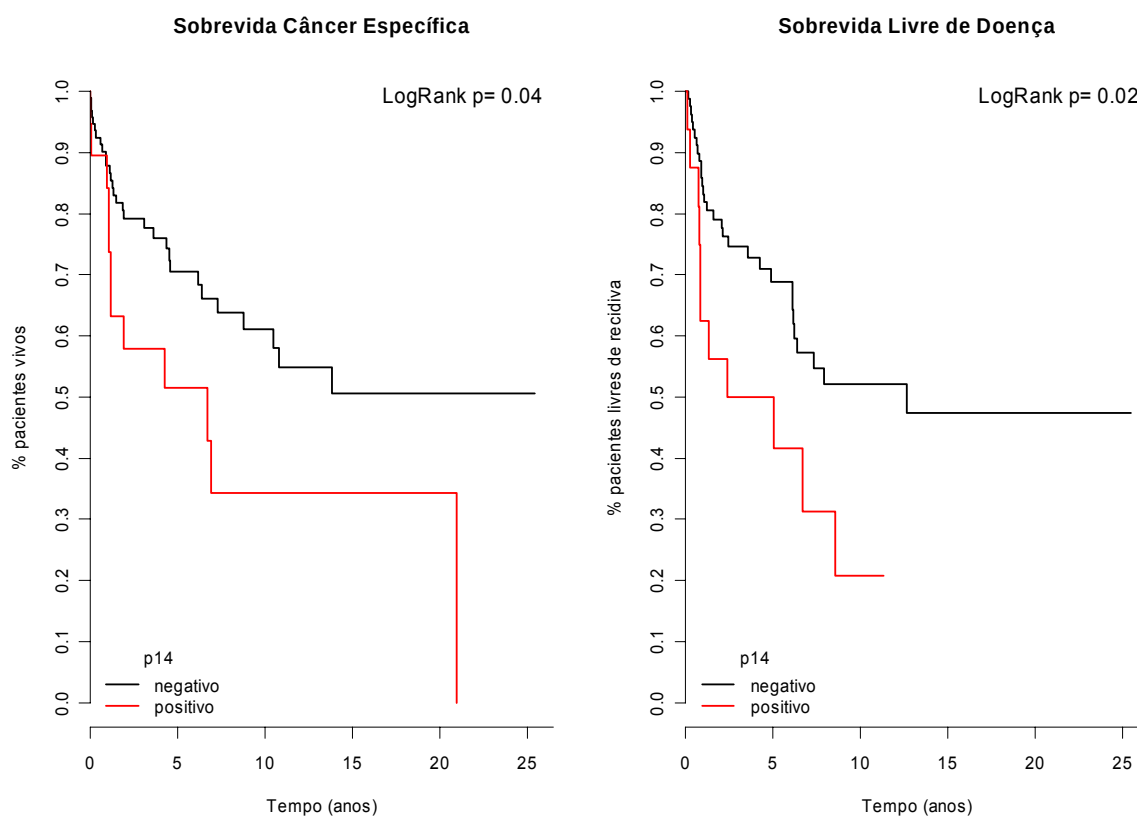


Figura 14 – Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p14 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.2 p16

A marcação positiva para p16 demonstrou significância estatística quando relacionada ao estadiamento FIGO. Nesses casos a expressão de p16 esteve mais presente nos casos com estadiamento FIGO I e II quando comparada aos estadios III ou IV ($p=0,023$). A presença de metástase

linfonodal seguiu a mesma tendência, naqueles casos em que havia acometimento linfonodal a marcação de p16 no tumor estava diminuída quando comparada aos casos em que não havia sinais de metástase nos linfonodos ($p=0,17$) apesar desse resultado não ser estatisticamente significativo. Outros sinais de agressividade da doença são a profundidade da invasão e a presença de invasão vascular e perineural. Em todas essas variáveis a expressão de p16 se manteve praticamente constante, entre os casos em que alterações descritas estavam ou não presentes ($p=0,36$, $p=0,53$ e $p=0,83$). A presença de infiltrado inflamatório e de lesões associadas também não foi associada à expressão da proteína p16 ($p=0,29$ e $p=0,91$) (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Associação entre a expressão IHQ de p16 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p16		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	55 (59)	27 (68)	82	0.36
	derme profunda	38 (41)	13 (33)	51	
Infiltrado inflamatório	leve	23 (25)	14 (35)	37	0.29
	moderado	59 (63)	24 (60)	83	
	intenso	11 (12)	2 (5)	13	
Invasão Vascular	não	77 (84)	35 (90)	112	0.53
	sim	15 (16)	4 (10)	19	
Invasão Perineural	não	82 (90)	34 (89)	116	0.83
	sim	9 (10)	4 (11)	13	
Metástase linfonodal	não	30 (59)	16 (76)	46	0.16
	sim	21 (41)	5 (24)	26	
Lesões Associadas	não	64 (73)	28 (74)	92	0.91
	sim	24 (27)	10 (26)	34	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	54 (58)	30 (79)	84	0.02
	III ou IV	39 (42)	8 (21)	47	

A sobrevida câncer específica e a sobrevida livre de doença não atingiram significância estatística ($p=0,37$ e $p=0,69$) (**Figura 15**).

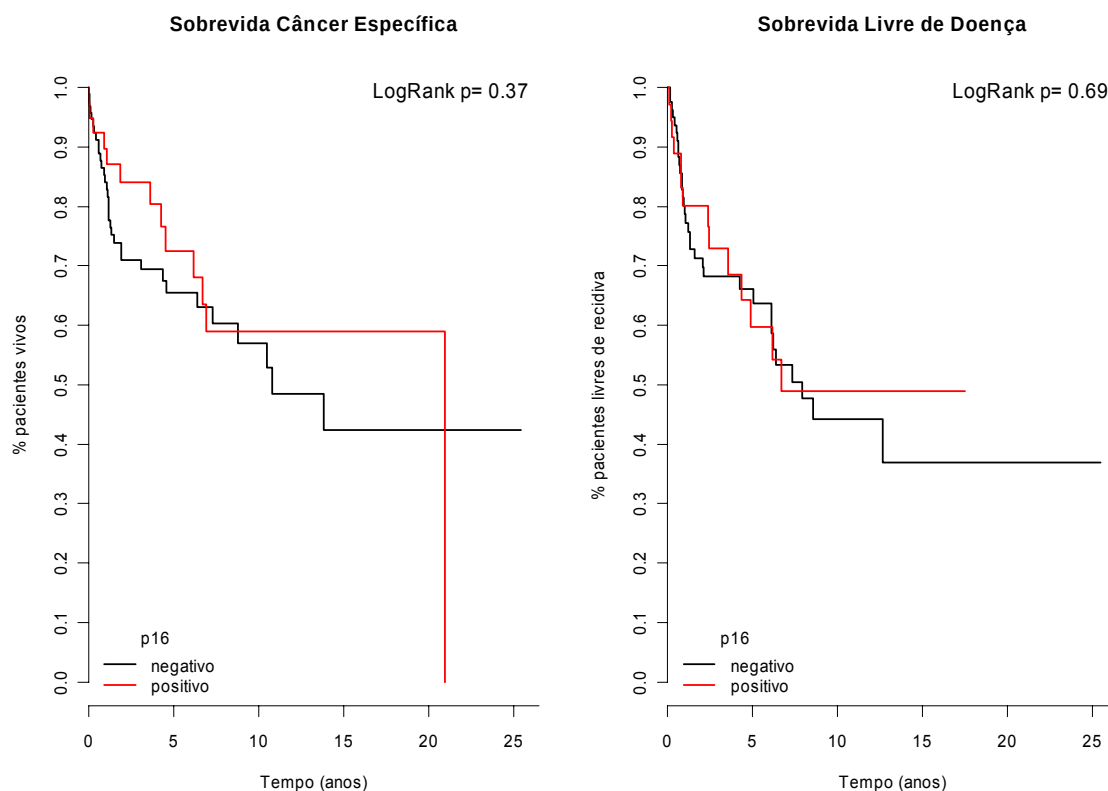


Figura 15 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p16 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.3 p21

Assim como a proteína p16, a expressão de p21 somente obteve correlação estatística em relação ao estadiamento FIGO ($p=0,03$). Essa análise demonstrou que quanto mais precoce o estadio das pacientes, menor a expressão de p21. Da mesma forma como descrito anteriormente, a metástase linfonodal, apesar de não alcançar significância estatística ($p=0,34$), mostrou-se mais ausente naqueles casos em que p21 não apresentou marcação.

A presença de infiltrado inflamatório não demonstrou relação com a expressão de p21 ($p=0,98$). O mesmo foi observado em relação à invasão vascular ($p=0,39$), invasão perineural ($p=0,17$) e as lesões associadas ($p=0,20$), que apresentaram porcentagens de positividade e negatividade para p21 semelhantes entre os grupos. Importante ressaltar que a maior parte das amostras era negativa para as variáveis invasão vascular, perineural e para as lesões associadas (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Associação entre a expressão IHQ de p21 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p21		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	56 (59)	23 (66)	79	0.48
	derme profunda	39 (41)	12 (34)	51	
Infiltrado inflamatório	leve	25 (26)	9 (26)	34	0.98
	moderado	60 (63)	21 (62)	81	
	intenso	10 (11)	4 (12)	14	
Invasão Vascular	não	76 (84)	32 (91)	108	0.39
	sim	15 (16)	3 (9)	18	
Invasão Perineural	não	78 (87)	33 (97)	111	0.17
	sim	12 (13)	1 (3)	13	
Metástase linfonodal	não	33 (60)	11 (73)	44	0.34
	sim	22 (40)	4 (27)	26	
Lesões Associadas	não	67 (75)	21 (64)	88	0.20
	sim	22 (25)	12 (36)	34	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	54 (58)	27 (79)	81	0.03
	III ou IV	39 (42)	7 (21)	46	

Os cálculos de sobrevida também não alcançaram relevância estatística, apresentando para a sobrevida câncer específica $p=0,96$ e para sobrevida livre de doença $p=0,4$. **(Figura 16)**

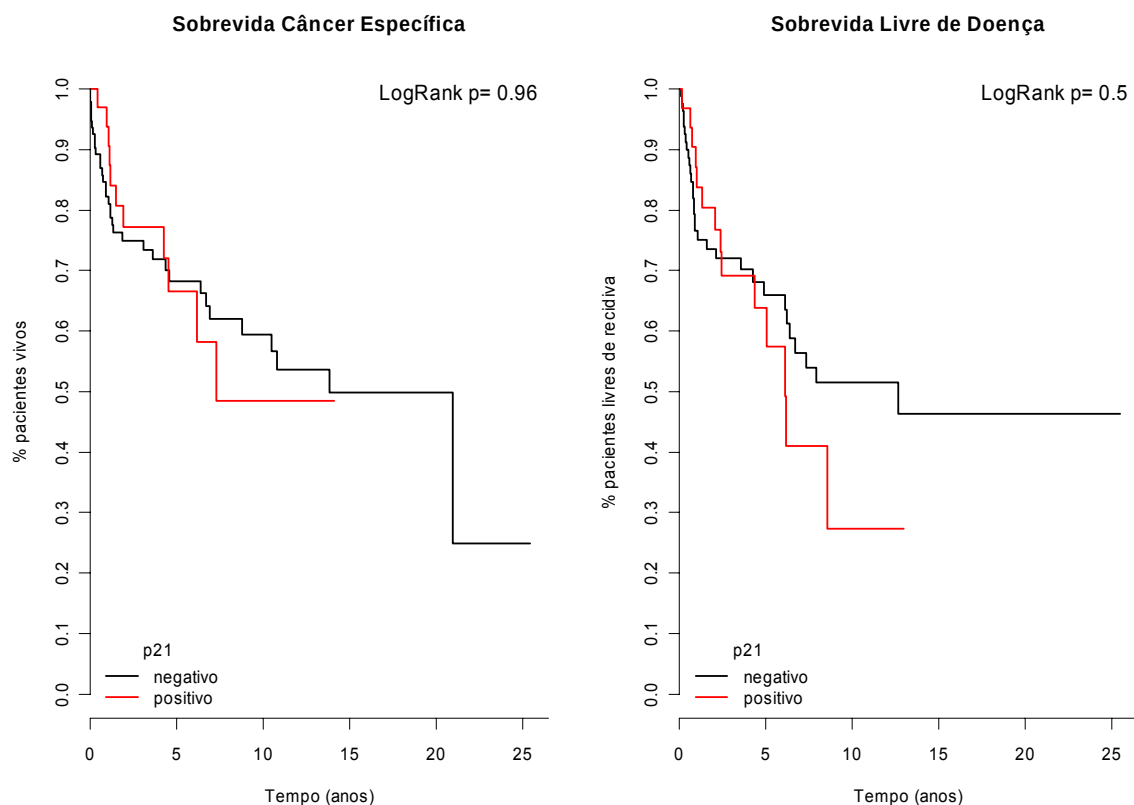


Figura 16 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p21 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.4 p27

A avaliação de p27 demonstrou que as lesões associadas ao carcinoma invasivo vulvar não apresentaram relação com a expressão da supressora de tumor p27 ($p=0,94$). Nessa avaliação a porcentagem de positivos e negativos para p27 foi semelhante entre os casos que apresentaram, ou não, lesões associadas. Observação similar foi constatada

em relação à invasão perineural ($p=0,89$), metástase linfonodal ($p=0,75$), estadiamento FIGO ($p=0,33$) e à presença de infiltrado inflamatório ($p=0,58$).

A presença de invasão vascular e a invasão nas camadas mais profundas foram mais observadas naqueles casos com expressão p27 ($p=0,12$ e $p=0,08$), demonstrando uma tendência dos casos positivos para essa proteína à invasão (**Tabela 19**).

Tabela 19 – Associação entre a expressão IHQ de p27 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p27		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	67 (64)	13 (46)	80	0.08
	derme profunda	37 (36)	15 (54)	52	
Infiltrado inflamatório	leve	27 (26)	9 (32)	36	0.58
	moderado	66 (64)	15 (54)	81	
	intenso	10 (10)	4 (14)	14	
Invasão Vascular	não	89 (89)	21 (75)	110	0.12
	sim	11 (11)	7 (25)	18	
Invasão Perineural	não	90 (90)	23 (88)	113	0.89
	sim	10 (10)	3 (12)	13	
Metástase linfonodal	não	39 (64)	7 (64)	46	0.75
	sim	22 (36)	4 (36)	26	
Lesões Associadas	não	72 (73)	18 (72)	90	0.94
	sim	27 (27)	7 (28)	34	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	64 (62)	18 (72)	82	0.33
	III ou IV	40 (38)	7 (28)	47	

Os casos com marcação positiva para essa proteína apresentaram piores índices de sobrevida. Contudo, nem a sobrevida câncer específica nem a livre de doença demonstraram relevância estatisticamente significativa, com valores de $p=0,39$ e $p=0,21$, respectivamente (**Figura 17**).

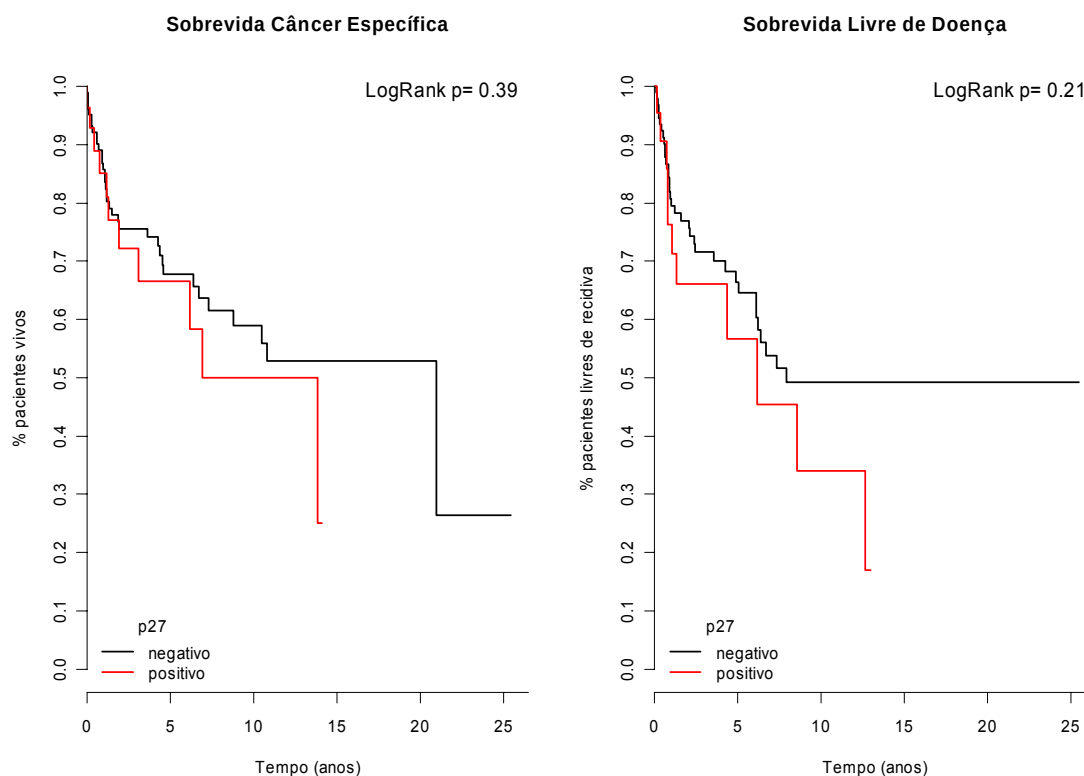


Figura 17 – Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p27 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.5 p53

A expressão de p53 não demonstrou qualquer relação estatística significativa com a presença ou ausência de invasão vascular ($p=0,97$), invasão perineural ($p=0,81$), metástase linfonodal ($p=0,82$) e estadiamento FIGO ($p=0,96$). Essas análises não apresentaram nenhum grau de

significância estatística. A profundidade da invasão tumoral também não revelou-se alterada na presença ou ausência da marcação de p53 ($p=0,48$).

A positividade de p53 revelou-se bastante elevada na presença de lesões associadas, o que levou a uma relação estatisticamente significativa ($p=0,04$). Outra tendência, apesar de não ter alcançado valor de $p \leq 0,05$, foi encontrada em relação ao infiltrado inflamatório. Nesses casos foi observada uma tendência de aumento da positividade para p53 conforme aumentou o grau de infiltrado inflamatório presente na região tumoral ($p=0,10$) (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Associação entre a expressão IHQ de p53 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p53		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	35 (57)	45 (63)	80	0.48
	derme profunda	26 (43)	26 (37)	52	
Infiltrado inflamatório	leve	23 (37)	14 (20)	37	0.10
	moderado	34 (55)	46 (67)	80	
	intenso	5 (8)	9 (13)	14	
Invasão Vascular	não	52 (85)	58 (87)	110	0.97
	sim	9 (15)	9 (13)	18	
Invasão Perineural	não	52 (88)	61 (91)	113	0.81
	sim	7 (12)	6 (9)	13	
Metástase linfonodal	não	23 (66)	24 (63)	47	0.82
	sim	12 (34)	14 (37)	26	
Lesões Associadas	não	48 (81)	42 (65)	90	0.04
	sim	11 (19)	23 (35)	34	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	38 (63)	44 (64)	82	0.96
	III ou IV	22 (37)	25 (36)	47	

A relação entre a expressão de p53 e a sobrevida das pacientes foi calculada, porém nenhum sucesso foi obtido nas avaliações, conforme observado na **Figura 18**.

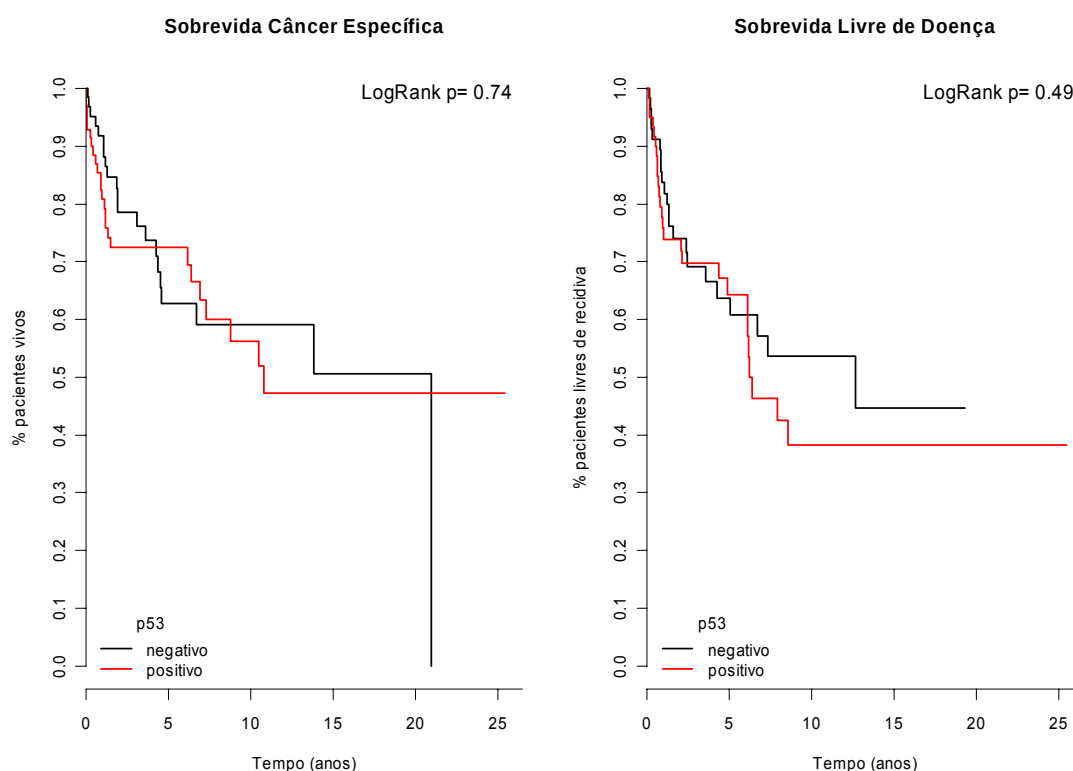


Figura 18 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p53 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.6 p63

A proteína supressora tumoral p63, bem como p16 e p21, apresentou ausência de expressão nos estádios mais avançados do carcinoma vulvar quando comparada aos casos com doença precoce ($p=0,03$). No entanto, a tendência de menor índice de metástase linfonodal observada nas demais proteínas supressoras de tumor, não foi observada para p63. Nesses casos

a metástase linfonodal não apresentou relação com a ausência ou a presença de expressão de p63 ($p=0,94$). Todas as outras variáveis não atingiram a relevância considerada estatisticamente significativa: profundidade de invasão ($p=0,33$), infiltrado inflamatório ($p=0,89$), invasão vascular ($p=0,73$), invasão perineural ($p=0,86$) e lesões associadas ($p=0,58$) (Tabela 21).

Tabela 21 – Associação entre a expressão IHQ de p63 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p63		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	33 (57)	40 (66)	73	0.33
	derme profunda	25 (43)	21 (34)	46	
Infiltrado inflamatório	leve	16 (27)	14 (24)	30	0.89
	moderado	37 (63)	38 (64)	75	
	intenso	6 (10)	7 (12)	13	
Invasão Vascular	não	48 (84)	52 (88)	100	0.73
	sim	9 (16)	7 (12)	16	
Invasão Perineural	não	50 (91)	52 (88)	102	0.86
	sim	5 (9)	7 (12)	12	
Metástase linfonodal	não	25 (66)	20 (67)	45	0.94
	sim	13 (34)	10 (33)	23	
Lesões Associadas	não	41 (73)	39 (68)	80	0.58
	sim	15 (27)	18 (32)	33	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	31 (53)	43 (73)	74	0.03
	III ou IV	27 (47)	16 (27)	43	

A expressão de p63 não demonstrou qualquer relação com a sobrevida câncer específica ($p=0,45$) ou com a sobrevida livre de doença ($p=0,82$) (**Figura 19**).

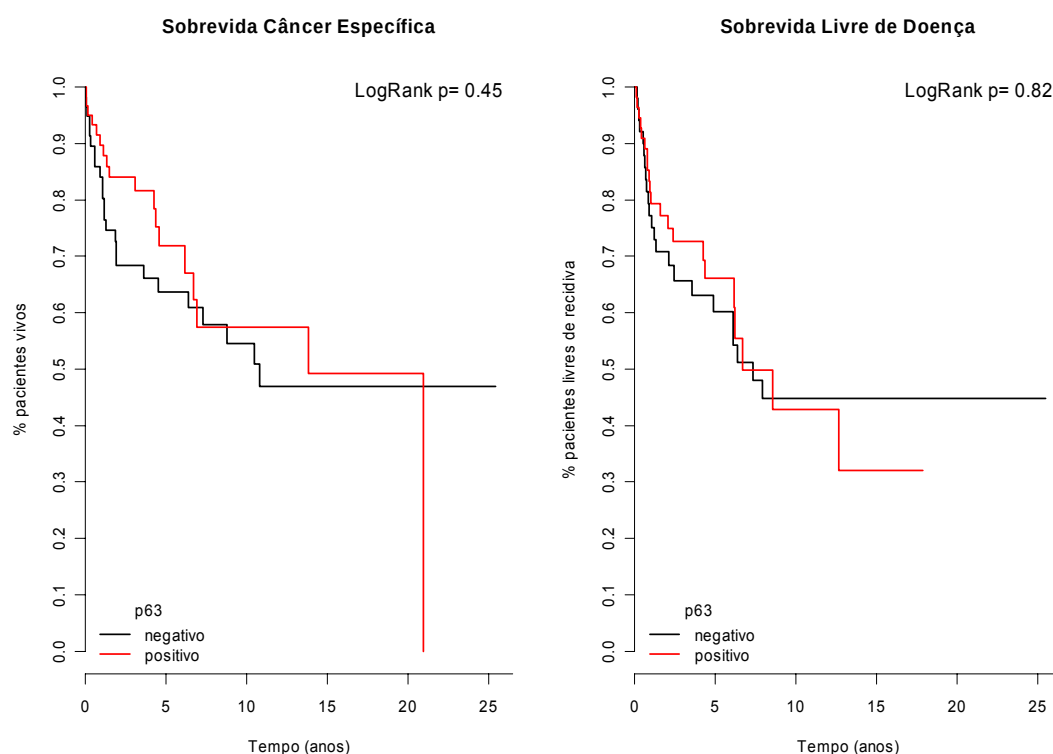


Figura 19 – Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p63 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.7 p73

A proteína p73 é considerada como membro da família p53, porém não apresentou a mesma relação e a mesma tendência de associação entre sua expressão e a presença de lesões associadas e infiltrado inflamatório ($p=0,99$ e $p=0,78$) encontrada na expressão de p53. A profundidade de

invasão do carcinoma vulvar e a invasão perineural também não demonstraram qualquer relação com a expressão de p73 ($p=0,54$ e $p=0,22$).

Seguindo o padrão observado em outras proteínas a redução na expressão de p73 correlacionou-se de maneira extremamente significativa com carcinomas vulvares classificados como FIGO I ou II ($p=0,01$). Outro achado relevante foi o menor número de metástases linfonodais observado naqueles casos onde ocorreu a perda de expressão de p73 ($p=0,02$). Interessante ressaltar que os casos com ausência de marcação para p73 apresentaram uma tendência menor a invadirem vasos ($p=0,06$) (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Associação entre a expressão IHQ de p73 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	p73		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	18 (58)	42 (65)	60	0.54
	derme profunda	13 (42)	23 (35)	36	
Infiltrado inflamatório	leve	7 (24)	20 (31)	27	0.78
	moderado	20 (69)	40 (62)	60	
	intenso	2 (7)	5 (8)	7	
Invasão Vascular	não	22 (73)	57 (90)	79	0.06
	sim	8 (27)	6 (10)	14	
Invasão Perineural	não	24 (83)	58 (94)	82	0.22
	sim	5 (17)	4 (6)	9	
Metástase linfonodal	não	9 (43)	24 (75)	33	0.02
	sim	12 (57)	8 (25)	20	
Lesões Associadas	não	21 (72)	45 (73)	66	0.99
	sim	8 (28)	17 (27)	25	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	12 (40)	45 (70)	57	0.01
	III ou IV	18 (60)	19 (30)	37	

A sobrevida câncer específica e a sobrevida livre de doença não demonstraram nenhuma relação com a expressão de p73 ($p=0,37$ e $p=0,85$) (Figura 20).

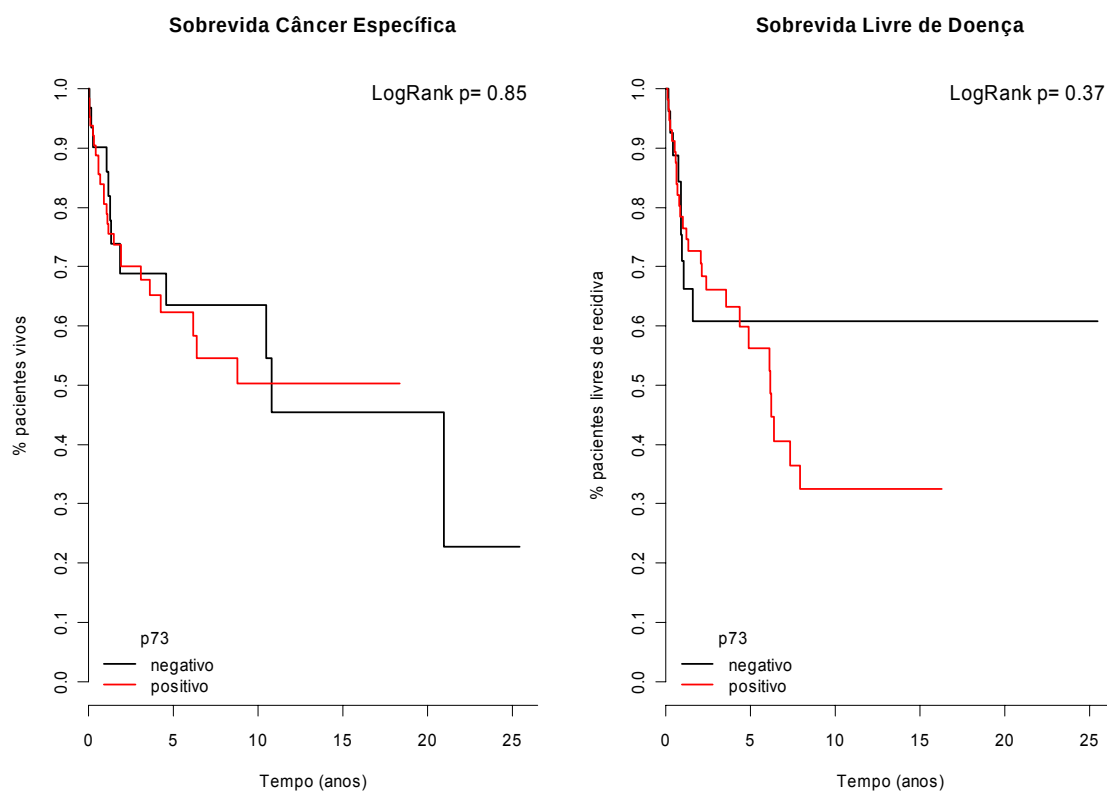


Figura 20 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de p73 em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.8 pRb

As variáveis anátomopatológicas invasão vascular, invasão perineural, metástase linfonodal e profundidade de invasão não apresentaram qualquer relação com a expressão de pRb ($p=0,95$, $p=0,83$, $p=0,78$ e $p=0,80$). O estadiamento FIGO, assim como as demais variáveis descritas, também não alcançou relevância significativa ($p=0,56$). A única variável que atingiu significância estatística com a expressão de pRb foi a presença de lesões associadas. Nesses casos houve uma redução significativa na proporção de casos que expressaram pRb ($p=0,02$). A presença de alto índice de infiltrado inflamatório seguiu a tendência de negatividade de marcação para pRb evidenciada na variável “lesões associadas” ($p=0,12$) (**Tabela 23**).

Tabela 23 - Associação entre a expressão IHQ de pRb com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	pRb		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	67 (61)	11 (58)	78	0.80
	derme profunda	43 (39)	8 (42)	51	
Infiltrado inflamatório	leve	31 (28)	2 (11)	33	0.12
	moderado	69 (63)	12 (67)	81	
	intenso	10 (9)	4 (22)	14	
Invasão Vascular	não	91 (86)	17 (89)	108	0.95
	sim	15 (14)	2 (11)	17	
Invasão Perineural	não	95 (90)	16 (89)	111	0.83
	sim	10 (10)	2 (11)	12	
Metástase linfonodal	não	40 (65)	6 (60)	46	0.78
	sim	22 (35)	4 (40)	26	
Lesões Associadas	não	70 (68)	18 (95)	88	0.02
	sim	33 (32)	1 (5)	34	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	70 (65)	11 (58)	81	0.56
	III ou IV	38 (35)	8 (42)	46	

A positividade para pRb demonstrou maior sobrevida câncer específica ($p=0,2$) e sobrevida livre de doença ($p=0,19$) conforme demonstrado na **Figura 21**.

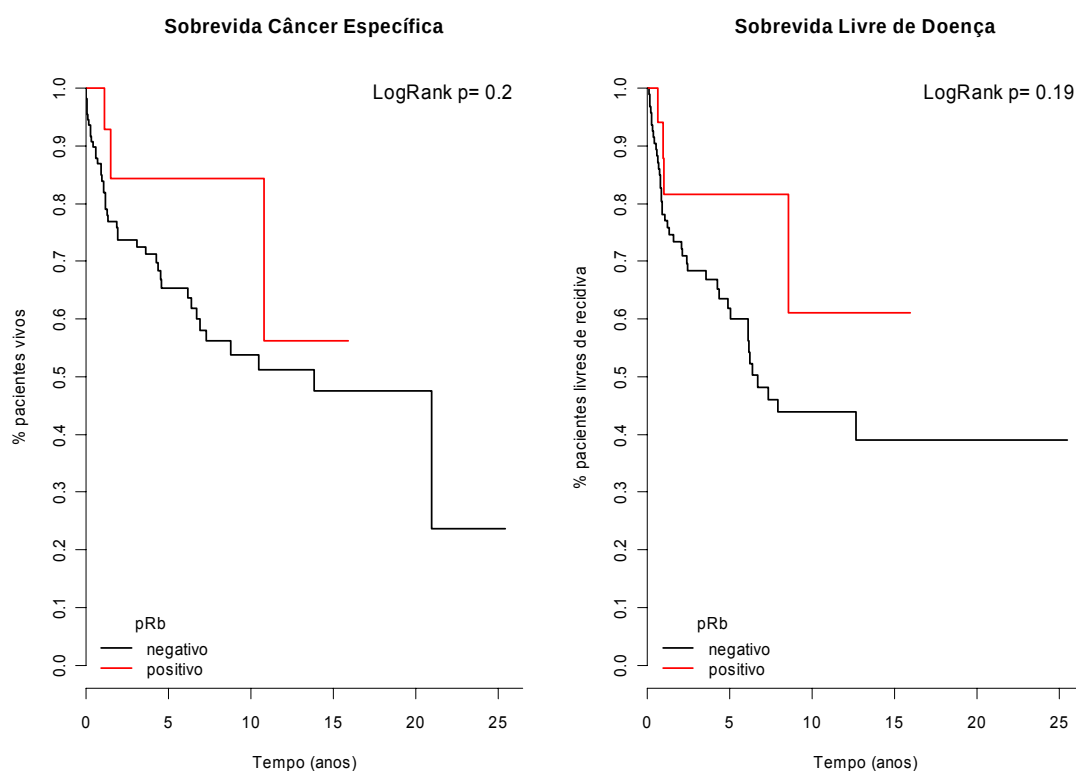


Figura 21 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de pRb em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.6.9 PTEN

O número pequeno de casos positivos para PTEN resultou na formação de grupos com poucas amostras para as análises estatísticas, dessa forma a significância das análises ficou prejudicada. Mesmo assim, foi possível verificar uma tendência de invasão menor naqueles casos com expressão de PTEN ($p=0,17$). Outra forte tendência foi observada entre a expressão de PTEN e a ausência de lesões associadas (0,08). Em relação às demais variáveis avaliadas, nenhuma demonstrou qualquer relação estatisticamente significativa com a expressão de PTEN, conforme observado em: infiltrado inflamatório ($p=0,56$), invasão vascular ($p=0,52$),

invasão perineural ($p=0,72$), metástase linfonodal ($p=0,50$) e estadiamento FIGO ($p=0,39$) (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Associação entre a expressão IHQ de PTEN com variáveis clínicas e anátomo-patológicas em carcinomas vulvares de pacientes do Hospital A.C. Camargo.

Variáveis	categoria	PTEN		Total	p
		neg	pos		
Profundidade da invasão	derme superficial	60 (59)	13 (76)	73	0.17
	derme profunda	42 (41)	4 (24)	46	
Infiltrado inflamatório	leve	26 (26)	5 (29)	31	0.56
	moderado	65 (64)	9 (53)	74	
	intenso	10 (10)	3 (18)	13	
Invasão Vascular	não	84 (85)	16 (94)	100	0.52
	sim	15 (15)	1 (6)	16	
Invasão Perineural	não	85 (88)	16 (94)	101	0.72
	sim	12 (12)	1 (6)	13	
Metástase linfonodal	não	41 (65)	4 (80)	45	0.50
	sim	22 (35)	1 (20)	23	
Lesões Associadas	não	66 (67)	14 (93)	80	0.08
	sim	32 (33)	1 (7)	33	
Estadiamento FIGO (2009)	I ou II	63 (62)	11 (73)	74	0.39
	III ou IV	39 (38)	4 (27)	43	

Os cálculos de sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença também não atingiram valores significantes estatisticamente ($p=0,35$ e $p=0,39$) (**Figura 22**).

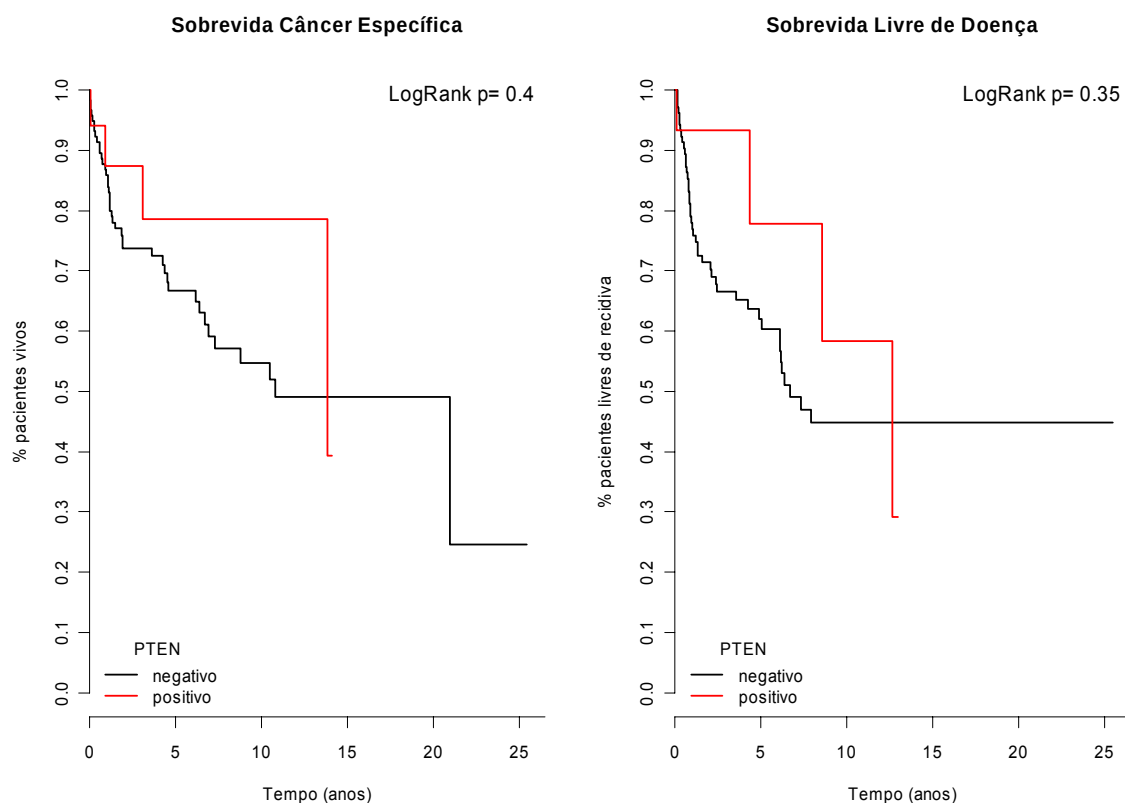


Figura 22 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença associadas à expressão IHQ de PTEN em pacientes portadoras de carcinoma vulvar provenientes do Hospital A.C. Camargo.

5.7 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73 E pRb

As proteínas envolvidas nas vias ARF-MDM2-p53 e INK4-ciclina/CDK-pRb avaliadas nesse estudo foram submetidas a uma análise múltipla para

avaliar a relação entre a expressão delas. Os dados gerados foram compilados na **Tabela 25**.

Tabela 25 - Associação entre a expressão das proteínas supressoras de tumor (p14, p16, p21, p27, p53, p63, p73 e pRb) mediante a análise IHQ em amostras teciduais provenientes de pacientes portadoras de carcinoma vulvar do Hospital A.C. Camargo.

	p16		p	p21		p	p27		p
	neg	pos		neg	pos		neg	pos	
p14			0,04			0,04			0,28
Neg	73 (88)	10 (12)		75 (88)	10 (12)		79 (86)	13 (14)	
Pos	23 (72)	9 (28)		21 (70)	9 (30)		17 (74)	6 (26)	
p16			-			0,18			0,15
Neg	-	-		77 (75)	26 (25)		82 (75)	28 (25)	
Pos	-	-		22 (63)	13 (37)		17 (61)	11 (39)	
p21						-			<0,001
Neg	-	-		-	-		92 (84)	18 (16)	
Pos	-	-		-	-		11 (39)	17 (61)	

Cont./Tabela 25

		p53		p	p63		p	p73		p	pRb		p
		neg	pos		neg	pos		neg	pos		neg	pos	
p14				0,48			0,65			0,14			0,92
	Neg	42	10		51	9		43	12		82	17	
		(81)	(19)		(85)	(15)		(78)	(22)		(83)	(17)	
	Pos	54	9		45	10		53	7		14	2	
		(86)	(14)		(82)	(18)		(88)	(12)		(88)	(13)	
p16				0,12			0,99			0,21			0,06
	Neg	44	23		56	22		55	17		82	37	
		(66)	(34)		(72)	(28)		(76)	(24)		(69)	(31)	
	Pos	55	16		43	17		44	22		17	2	
		(77)	(23)		(72)	(28)		(67)	(33)		(89)	(11)	
p21				0,24			0,01			0,2			0,04
	Neg	53	14		65	13		57	15		93	26	
		(79)	(21)		(83)	(17)		(79)	(21)		(78)	(22)	
	Pos	50	21		38	22		46	20		10	9	
		(70)	(30)		(63)	(37)		(70)	(30)		(53)	(47)	
p27				0,27			0,04			0,13			0,69
	Neg	56	11		67	11		61	11		96	23	
		(84)	(16)		(86)	(14)		(85)	(15)		(81)	(19)	
	Pos	54	17		43	17		49	17		14	5	
		(76)	(24)		(72)	(28)		(74)	(26)		(74)	(26)	
p53				-			0,002			0,04			0,27
	Neg	-	-		47	31		41	31		60	59	
					(60)	(40)		(57)	(43)		(50)	(50)	
	Pos	-	-		20	40		26	40		7	12	
					(33)	(67)		(39)	(61)		(37)	(63)	
p63							-			0,01			0,02
	Neg	-	-		-	-		48	24		72	47	
								(67)	(33)		(61)	(39)	
	Pos	-	-		-	-		30	36		6	13	
								(45)	(55)		(32)	(68)	
p73										-			0,97
	Neg	-	-		-	-		-	-		62	57	
											(52)	(48)	
	Pos	-	-		-	-		-	-		10	9	
											(53)	(47)	

Nessas análises foram observadas relações estatísticas significativas entre as expressões das seguintes proteínas: p14 x p16 ($p=0,04$), p14 x p21 ($p=0,04$), p21 x p27 ($p<0,001$), p21 x p63 ($p=0,01$), p27 x p63 ($p=0,04$), p53 x p63 ($p=0,002$), p53 x p73 ($p=0,04$), p63 x p73 ($p=0,01$) e p63 x pRb ($p=0,02$). As demais associações não apresentaram valor de $p\leq 0,05$.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma vulvar é uma doença que ainda hoje é vista como rara, acometendo cerca de 1,8/100.000 mulheres. No entanto essa incidência vem crescendo e conhecer as características das mulheres acometidas por essa doença, bem como a própria doença em seus aspectos macroscópicos e moleculares se faz extremamente importante (PINTO 2002; KNOPP et al. 2009).

O carcinoma vulvar geralmente acomete mulheres com idade mais avançada, entre a sétima e a oitava década de vida, e suas taxas sobem progressivamente a partir dessa idade (DE HULLU et al. 2006; DE HULLU e VAN DER ZEE 2006; JUDSON et al. 2006; LANNEAU et al. 2009; DITTMER et al. 2011). Os dados obtidos nesse estudo corroboram essa informação, uma vez que a idade média e mediana ao diagnóstico de carcinoma vulvar foram 69 e 71 anos, respectivamente. Mesmo encontrando a maior parcela dos tumores acometendo mulheres acima dos 50 anos, a variação de idade encontrada foi extrema, variando entre 15 e 98 anos. Alguns autores descrevem o aparecimento do carcinoma vulvar em mulheres jovens (abaixo dos 50 anos) como um processo diretamente relacionado à presença da infecção por HPV e outros fatores de risco, tais quais: o uso de tabaco e a displasia vulvar (HORDING et al. 1994; LANNEAU et al. 2009). No nosso estudo o número pequeno de pacientes incluídas no grupo abaixo dos 50 anos não nos permitiu avaliar a relação da infecção por HPV ou qualquer

outra variável que pudesse distinguir esse grupo do outro, formado pelas mulheres acima dos 50 anos.

Outro fator relevante, já descrito pela literatura, é a prevalência de casos de carcinoma vulvar em mulheres brancas (SARAIYA et al. 2008; WATSON et al. 2009). Nesse estudo as mulheres brancas corresponderam a 88,9% do total de pacientes incluídas o que demonstra uma concordância fidedigna aos achados de outros autores.

O baixo grau de instrução escolar (analfabetas ou com 1º grau completo) demonstrou ser o mais freqüente entre as mulheres, tendo representado mais de 70% das mulheres incluídas no presente estudo. Pouco foi demonstrado até o momento em relação aos anos de estudo e o aparecimento do carcinoma vulvar. BASTA et al. (1999) relacionaram os baixos níveis de instrução à uma menor condição sócio-econômica. Eles demonstraram que nesses casos o risco de desenvolvimento de carcinoma vulvar é maior uma vez que essas mulheres possuem menos acesso a informação relacionada à higiene e às doenças sexualmente transmissíveis. Nesse grupo, a infecção por HPV se enquadra como um fator de risco relevante para o aparecimento do carcinoma vulvar, no entanto a presença de infecção por HPV nos nossos casos não foi capaz de separar os grupos com baixos e altos índices de escolaridade ($p=0,8719$). Esse fato pode ter ocorrido pelo fato da maior parte das mulheres acometidas por carcinoma vulvar nesse trabalho relatarem apenas apenas um parceiro sexual durante sua vida (87,7%).

Entre os sintomas o mais comumente descrito foi o prurido, presente em 70,1% das mulheres. Esse achado é corroborado por outros autores que demonstraram em suas coortes o mesmo sintoma como o mais freqüente (DE HULLU et al. 2006; LANNEAU et al. 2009). A duração dos sintomas até o diagnóstico do carcinoma vulvar foi extremamente variável (0,5 a 120 meses), com uma mediana de 6 meses. LANNEAU et al. (2009) fizeram observações muito semelhantes. Na casuística avaliada por eles, o tempo médio entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico é de seis meses, além disso, descreveram que a duração dos sintomas pode durar mais de dez anos.

Importante ressaltar que apesar da duração dos sintomas ser longa, a maioria dos carcinomas vulvares foi classificada em estadios precoces (FIGO I e II). O estadiamento mais freqüentemente encontrado foi o IB, conforme já visto em outros trabalhos (SCHEISTROEN et al. 2002; DE HULLU et al. 2006; LANNEAU et al. 2009). Esses achados corroboram a teoria do lento crescimento do carcinoma vulvar e a tendência dele permanecer como doença localizada por um longo período de tempo (MAGGINO et al. 2000; SCHEISTROEN et al. 2002).

O diagnóstico dos carcinomas vulvares em estadios iniciais reflete diretamente no tratamento indicado conforme recomendação da FIGO (PECORELLI 2009): para os casos classificados como FIGO 0 e IA (<2cm) deve ser um tratamento superficial ou vulvectomy parcial, para os casos FIGO IB com invasão do estroma maior que 1cm e para aqueles FIGO II com tumor maior que 2cm o tratamento de escolha deve ser feito com

vulvectomy parcial e linfadenectomy. Por fim, para os casos estadiados em III e IVA o tratamento deve ser a vulvectomy radical associada à linfadenectomy. No presente estudo todas as pacientes foram submetidas a cirurgia, com o procedimento variando de acordo com a necessidade de cada caso, conforme recomendado pela FIGO (PECORELLI 2009).

Apesar do aprimoramento das técnicas diagnósticas e cirúrgicas é notório que cerca de um terço das pacientes sofrem recidivas em algum momento (COULTER e GLEASON 2003), tais achados foram corroborados pelas observações feitas na nossa casuística uma vez que 38,3% das pacientes apresentaram recorrências. A recidiva local atingiu 35,8% das pacientes enquanto em outros trabalhos esse achado variou entre 53% e 86% (PIURA et al. 1993; MAGGINO et al. 2000; SCHEISTROEN et al. 2002; COULTER e GLEASON 2003). Essa redução pode ser atribuída a cirurgias menos conservadoras que podem ter impedido a formação de novos tumores na mesma região. A recorrência linfonodal varia na literatura entre 11% e 38% (PREMPREE e AMORNARN 1984; BRANDENBERGER et al. 1992; PIURA et al. 1993; MAGGINO et al. 2000), e foi observada em 22,6% das pacientes incluídas nesse trabalho. Já a recidiva à distância foi menos freqüente (9,4%), porém esse achado está em concordância com os demais trabalhos já publicados que descrevem a recidiva à distância variando entre 8-37% dos casos de carcinoma vulvar (PREMPREE e AMORNARN 1984; MAGGINO et al. 2000).

Importante ressaltar que a recidiva linfonodal e à distância são atribuídas a alguns fatores como a profundidade da invasão e a invasão dos

vasos (COULTER e GLEASON 2003). Isso ocorre, pois a invasão do tumor nas camadas mais inferiores do tecido permite maior contato com vasos e nervos e com isso aumentam as chances de metástases (DING et al. 2011). Nos carcinomas vulvares as porções superficiais e mediais da derme foram as mais acometidas, compreendendo 60,6% do total. A invasão vascular, bem como a invasão perineural, não foram achados freqüentes, sendo observados em 15% e 10,7% dos casos, respectivamente. Tais variáveis são conhecidas, junto à metástase linfonodal, como sinais de bom prognóstico quando ausentes em tumores e, portanto esse resultado demonstra uma doença menos agressiva para as pacientes em questão.

No contexto da avaliação prognóstica observamos que a infecção por HPV não demonstrou relação com nenhum dos fatores envolvidos na avaliação anátomo-patológica; dessa forma, não pode ser considerada como um fator prognóstico isolado conforme proposto por MONK et al. (1995) e KNOOP et al. (2006). Outros trabalhos, ao contrário dos supracitados, corroboraram com os dados gerados nesse estudo. Nesses trabalhos não foi possível encontrar nenhum fator prognóstico relevante envolvido com a infecção por HPV (BLOSS et al. 1991; PINTO et al. 2004; KAGIE et al. 1997a). A relação prognóstica discrepante encontrada pode ser associada à metodologia utilizada por cada autor para definir a infecção pelo Papilomavírus humano.

A falta de relação prognóstica envolvendo a infecção por HPV encontrada nesse trabalho, não o isenta do papel já descrito na carcinogênese vulvar (MCCLUGGAGE et al. 2009). Segundo ZUR HAUSEN

(2002) o HPV promove a proliferação exacerbada das células epiteliais por meio das suas oncoproteínas E6 e E7. Dentre as funções descritas por ZUR HAUSEN (2002) está a interação entre E6 e p53 e de E7 com pRb, ambas levando a perda dessas proteínas que agem no controle do ciclo celular. Importante ressaltar que somente as oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são capazes de desempenhar papel relevante no descontrole do ciclo celular, portanto a carcinogênese promovida pela infecção viral somente ocorre naqueles casos onde o tipo infectante está entre os de alto risco como: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV54, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66, HPV68 E HPV69 (ZUR HAUSEN 2002).

Entre os carcinomas vulvares a presença de infecção por HPV, seja ela uma infecção simples (por apenas um tipo viral) ou mista (por mais de um tipo viral), foi encontrada em 41% dos casos avaliados, corroborando os dados da literatura que demonstra uma variação de 9% a 57%, dependendo do método de detecção (BRANDENBERGER et al. 1992; LEE et al. 1994; IWASAWA et al. 1997; LERMA et al. 1999; PINTO et al. 2004; KNOPP et al. 2006). Em relação ao tipo viral infectante, nos carcinomas vulvares (KNOPP et al. 2006; KLEMBA et al. 2011), assim como nos carcinomas cervicais (ZUR HAUSEN 2002) o tipo infectante mais encontrado é o HPV16. No presente estudo essa informação foi confirmada, uma vez que a presença do HPV16 foi demonstrada em mais de 30% dos casos positivos para HPV, quando considerados os casos em que houve co-infecção por mais de um tipo viral.

Conforme elucidado por ZUR HAUSEN (2002) a infecção pelo Papilomavírus humano representa uma ameaça ao controle do ciclo celular, uma vez que algumas de suas oncoproteínas atuam de forma direta, ou indireta, nesse mecanismo, degradando algumas proteínas como p53 e pRb ou favorecendo a expressão de outras como p16. Entre as proteínas estudadas a infecção por HPV não apresentou relação estatística significativa com nenhuma delas, no entanto p16 mostrou uma tendência à positividade naqueles casos onde a infecção estava presente ($p=0,06$). Esses dados contrariam grande parte dos estudos publicados até o momento que demonstraram, principalmente, redução na expressão de p53 e aumento na expressão de p16 (MCCONNELL et al. 1997; RIETHDORF et al. 2004; KNOPP et al. 2006; VAN DER AVOORT et al. 2006; HOEVENAARS et al. 2008). KNOPP et al. (2006) também demonstrou relação significativa entre a expressão de p14 e p27 com a infecção por HPV. Nos casos HPV positivos a oncoproteína E7 pode promover a expressão de INK4 (p16), e como consequência a hiper expressão de p14, uma vez que ambos compartilham o mesmo locus. Outra atribuição de E7 é a o bloqueio na ação dos inibidores de cinase dependentes de ciclinas (CDKIs) p21 e p27 (ZUR HAUSEN 2002).

As CDKIs são importantes moléculas envolvidas no controle do ciclo celular (SHERR e ROBERTS 1999; KNOPP et al. 2009). Elas inibem a formação do complexo ciclina-CDK, assim impedindo a fosforilação de pRb e a progressão no ciclo celular (SHERR e ROBERTS 1999; KNOPP et al. 2009). A proteína p21 atua sob regulação de p53 (POMERANTZ et al. 1998;

STOTT et al. 1998; ZHANG et al. 1998), porém nenhuma relação entre a expressão dessas proteínas foi estabelecida ($p=0,2414$). Somente foi encontrada relação significativa entre p21 e p14 ($p=0,042$) que tem o papel de impedir a ação de degradação de p53 promovida por MDM2 (POMERANTZ et al. 1998; STOTT et al. 1998; ZHANG et al. 1998). Isso demonstra que outros mecanismos de regulação dessa proteína estão presentes nos carcinomas vulvares.

No presente estudo pouca marcação foi observada para p21 e p27 que apresentaram positividade em 26,5% e 20,9% dos casos, respectivamente. Essa observação corrobora, em parte os achados de KNOPP et al. (2004) que encontraram p21 e p27 positivos em 42% e 24% dos casos, respectivamente. Porém ela diverge de outro estudo que encontrou expressão de p27 presente em 69% dos casos (ZAMPARELLI et al. 2001). A divergência encontrada para a porcentagem de casos positivos para p21 pode ser explicada devido às diferenças nos *scores* utilizados. Apesar do *score* usado para avaliar as reações de imuno-histoquímica desse estudo ser baseado no *score* estabelecido por KNOPP et al. (2004), a classificação sofreu algumas modificações para reduzir os efeitos da maior sensibilidade promovida pela análise automatizada o que provavelmente restringiu os resultados para aqueles casos positivos inequívocos. O presente estudo e o estudo conduzido por ZAMPARELLI et al. (2001) apresentaram *score* semelhante para classificar p27, porém no presente trabalho foram considerados negativos aqueles casos com intensidade de marcação fraca o que gerou um grande número de casos negativos, porém

se esses casos fossem incluídos nas análises os casos positivos somariam 57,4% do total.

Relevante ressaltar que houve concordância entre o aumento de p21 e de p27 nos casos avaliados ($p < 0,0001$) demonstrando que essas duas proteínas compartilham mecanismos de estimulação. Essa relação não havia sido descrita em carcinomas vulvares, porém já foi observada em neoplasias de laringe (PESCHOS et al. 2005), e nesses casos a co-expressão de p21 e p27 foi um fator determinante para uma doença mais agressiva, pois nesses casos a expressão de Ki-67 foi encontrada significativamente mais elevada. Segundo os autores outros fatores estariam atuando sobre a regulação do ciclo celular, uma vez que a marcação de Ki-67 sugere que a célula esteja em proliferação. No presente estudo essa hipótese é corroborada pela observação do aumento dessas proteínas estar atrelado ao aumento na expressão da variante $\Delta Np63$ da proteína p63 homóloga à p53. Essa isoforma não mantém os efeitos supressores tumorais normalmente observados na proteína íntegra, atuando negativamente sobre as formas selvagens de p53, p63 e p73 (VAN BOKHOVEN e BRUNNER 2002; PIETSCH et al. 2008). Dessa maneira a célula tumoral possui maior habilidade de evasão aos mecanismos de controle do ciclo celular, tais como as CDKIs. Outro fator importante que sustenta essa hipótese é o fato desses supressores apresentarem pouca ou nenhuma relação com as variáveis anátomo-patológicas avaliadas. No entanto, a expressão de p21 foi correlacionada à expressão de pRb, portanto, seu papel supressor poderia estar em parte preservado e isso pode

ter refletido na relação estabelecida entre a presença de p21 e os estadiamentos FIGO I e II ($p=0,026$).

Apesar disso a expressão de p21 não sugere relação alguma com o prognóstico da doença, pelo contrário, uma vez que KNOFF et al. (2004), associaram a expressão de p21 a piores taxas de sobrevida nas pacientes estadiadas como FIGO I e II. Essa relação inesperada pode ser explicada pela infecção por pelo vírus HPV, uma vez que a sua oncoproteína E7 é capaz de bloquear a ação de p21 (ZUR HAUSEN 2002); pela formação de complexos com o antígeno nuclear de proliferação celular (*do inglês* – PCNA), liberando assim o complexo ciclina-CDK (ERBER et al. 1997) ou mesmo pelo aumento na expressão de ciclina D1 (VAN OIJEN et al. 1998). A perda de expressão da p27 não apresentou relação com o estadiamento da doença, demonstrando que esse evento pode ocorrer na fase inicial da carcinogênese vulvar. Porém para elucidar essa hipótese um estudo envolvendo lesões pré neoplásicas seria necessário.

Eventual estudo comparativo poderia avaliar a possível relação entre a expressão do gene *CDKN1A* (*p21*) com os processos iniciais da carcinogênese vulvar, visto que foi encontrada uma diminuição significativa na expressão do RNA mensageiro (mRNA) nos carcinomas vulvares quando comparados aos tecidos normais ($p=0,002$). Segundo RONINSON et al. (2002), mutações somáticas são raras nesse gene, no entanto cerca de 40 polimorfismos já foram descritos (National Institute of Environmental Health Sciences-NIEHS 2004), alguns deles alterando a função da proteína p21 (MOUSSES et al. 1995; LI et al. 2005). No entanto, nenhum desses achados

seria capaz de elucidar o mecanismo pelo qual ocorreu a redução na expressão do gene *CDKN1A* nos carcinomas vulvares avaliados, porém uma hipótese proposta por LI et al. (2005) sugere que pelo menos um desses polimorfismos pode alterar a estabilidade do mRNA de p21, alterando assim sua expressão. Importante ressaltar que a região de tecido normal utilizada para as análises foi obtida a partir de borda tumoral, portanto não podemos afirmar que esteja livre de doenças associadas ou de influências do próprio tumor. Além disso, não podemos deixar de mencionar que o aumento na expressão da proteína p21 não foi observado na maioria dos casos avaliados por qRT-PCR.

Ainda a respeito da expressão gênica de *CDKN1A* (*p21*), a diminuição na expressão de *p21* nas amostras tumorais ocorreu de maneira concomitante à diminuição na expressão do gene *TP53*, corroborando assim os dados de XIONG et al. (1993) que descreveram a notória relação entre a expressão de p53 e p21, demonstrando que o aumento de p53 em resposta a danos no DNA age induzindo o aumento de expressão de p21, levando à parada no ciclo celular no *checkpoint* de G1 ou à apoptose.

A proteína p16, membro da família das CDKIs, também foi avaliada nesse trabalho e apresentou marcação positiva em 29,4% dos carcinomas vulvares avaliados. Importante ressaltar que nesse trabalho somente a marcação nuclear de p16 foi considerada positiva, uma vez que a avaliação citoplasmática não é um consenso na literatura. Os demais estudos em que a expressão dessa proteína foi analisada demonstraram-na com positividade nuclear e/ou citoplasmática entre 24,3% e 43% (CHAN et al. 1998; KNOPP

et al. 2004; NOGUEIRA et al. 2006; TRINGLER et al. 2007). KNOPP et al. (2004) encontraram grande associação entre a alta expressão de p16 e risco reduzido de desenvolver metástases linfonodais e de óbito por câncer vulvar, principalmente entre as mulheres jovens. Essa associação pode ter sido fortalecida pelo fato das infecções por HPV serem mais freqüentes nesse grupo de mulheres, e essa infecção ser considerada um fator de bom prognóstico nos carcinomas vulvares, uma vez que as pacientes apresentam maiores taxas de sobrevida (KNOPP et al. 2006). A relação entre as metástases linfonodais e sobrevida com a expressão de p16 não foi alcançada nesse estudo, provavelmente pela falta de relação entre a infecção pelo Papilomavírus humano e a expressão dessa proteína ($p=0,06$). No entanto a expressão de p16 obteve relação estatisticamente significativa com os estadiamentos FIGO I e II ($p=0,023$). Esse fato sugere uma tendência de melhor prognóstico associada à expressão de p16, conforme relatos de alguns autores (KNOPP et al. 2004; TRINGLER et al. 2007), uma vez que os casos estadiados como FIGO I e II apresentam tumores mais superficiais e um tratamento menos invasivo pode ser proposto (PECORELLI 2009).

A expressão do RNA mensageiro codificador da proteína também foi avaliada, e como resultado obtivemos uma elevada expressão nas amostras tumorais quando correlacionadas às respectivas amostras normais provenientes da borda tumoral. Essa alteração, pelo menos em teoria, não está correta, uma vez que a proteína codificada se trata de uma supressora tumoral. No entanto, o fato dessas análises terem sido realizadas com uma

quantidade elevada de amostras HPV positivas pode ser sugestivo de interferência da oncoproteína viral E7 na liberação de E2F com conseqüente estimulação do locus de gênico de p16 conforme descrito por outros autores para explicar a expressão elevada da proteína p16 em carcinomas vulvares (RIETHDORF et al. 2004; KNOPP et al. 2004, 2006).

O locus gênico dessa proteína também é responsável pela formação de outra proteína, a p14, por meio de um exon alternativo. O mRNA codificador de p16 é transcrito a partir da interação do exon 1 α com os exons 2 e 3, enquanto o mRNA de p14 é formado a partir da interação entre os exons 2 e 3 com um splicing alternativo do exon 1 β (HABER 1997; LLOYD 2000).

As análises protéicas de p14 e p16 demonstraram íntima relação entre o aumento de p14 concomitante ao de p16 ($p=0,037$) confirmando os achados de KNOPP et al. (2004). Outro fator que corroborou esses achados foi o padrão de expressão do mRNA de p14, que foi bastante semelhante ao observado nas análises do transcrito de p16, revelando ser mais expresso nos tumores em relação às amostras normais ($p<0,001$). Dessa forma, podemos inferir que a relação entre p14 e p16 se deve provavelmente ao compartilhamento do locus gênico e de fatores estimuladores da transcrição, como a infecção por HPV.

A expressão de mRNA de p14, assim como as demais análises de qRT-PCR, não foi passível de relação com as variáveis clínicas e anátomo-patológicas, porém essa relação pode ser inferida partindo do pressuposto que o aumento da expressão de mRNA normalmente é seguido por aumento

na expressão protéica. Nesse estudo a positividade para p14 demonstrou grande afinidade aos casos em que houve invasão vascular, quando comparados àqueles casos em que não foi possível identificar a expressão da proteína ($p=0,047$). A marcação imunohistoquímica de p14 também separou as pacientes em dois grupos em relação à sobrevida: o primeiro, positivo para p14, demonstrou pior sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica, o segundo grupo, composto por tumores negativos para p14, demonstrou melhores taxas de sobrevida. Esse fato contraria os achados em outros trabalhos que encontraram a baixa expressão de mRNA de p14 em carcinomas de esôfago e da proteína em carcinomas de língua, como fatores de pior prognóstico (KWONG et al. 2005; ITO et al. 2007). Também contraria os achados de KNOPP et al. (2006), que demonstraram melhor sobrevida, e valor prognóstico positivo em análises multivariadas para aqueles casos de carcinoma vulvar com p14 positivo.

Outra diferença encontrada foi o número de casos positivos nesse estudo (16,4%) comparados aos observados por KNOPP et al. (2006) (35,9%). A diferença no número de casos positivos pode ser atribuída à avaliação desse marcador, que além de sofrer influência devido ao avaliador, também apresentou heterogeneidade de marcação nucleolar, podendo assim ter sofrido com falsos negativos. Tal informação é corroborada pelo fato do único outro estudo envolvendo a expressão de p14 em carcinomas vulvares ter descrito positividade em aproximadamente 58% dos casos avaliados (O'NIONS et al. 2001).

Já a diferença encontrada entre a relação prognóstica pode ser explicada pela ação dúbia de E2F. Esse fator de transcrição é liberado com a fosforilação de pRb e pode promover ações anti tumorais, como indução de p73, p14 e p16, além de fatores pró tumorais, como atuar induzindo a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular. Esse fator de transcrição sofre influência da interação de diversas proteínas do ciclo celular, bem como de proteínas externas como a E7 do vírus HPV (IRWIN et al. 2000; ZUR HAUSEN 2002). Em carcinomas de esôfago a expressão de E2F foi descrita como um fator prognóstico adverso (YAMAZAKI et al. 2005), portanto, levando em consideração essa informação, podemos sugerir que nos carcinomas vulvares os efeitos pró-tumorais podem sobrepujar os efeitos benéficos supressor de tumores que ela pode induzir, como o estímulo de p14.

O fator de transcrição E2F, conforme descrito, possui uma íntima relação com a proteína supressora tumoral pRb (DU e POGORILER 2006), que, por sua vez, já foi descrita com expressão reduzida em diversos tumores como carcinoma de mama (JARES et al. 1997), de pulmão (BETTICHER et al. 1997) e de bexiga (COTE et al. 1998). Em carcinomas vulvares, a perda de expressão de pRb também é um achado freqüente (CHAN et al. 1998; ROLFE et al. 2001; LERMA et al. 2002; KNOPP et al. 2006) corroborando a avaliação IHQ desse estudo, que encontrou altas taxas de negatividade para pRb.

A expressão de pRb, quando comparada às variáveis clínicas e anátomo-patológicas, foi relacionada significativamente somente àqueles

casos que não apresentaram lesões associadas, e naqueles que continham, a positividade para essa proteínas foi irrelevante. A falta de relação de pRb com as variáveis avaliadas corroborada por outros autores (LERMA et al. 1999; KNOPP et al. 2006) e o grande número de casos negativos observados, sugerem que pRb esteja envolvido em processos iniciais da carcinogênese vulvar, conforme já sugerido por ZAMPARELLI et al. (2001).

A relação entre a presença de lesões associadas e a expressão de pRb na literatura é limitada, porém CHAN et al. (1998) demonstraram que a neoplasia intraepitelial vulvar, enquanto lesão precursora, apresentou ausência de expressão para pRb em 60% dos casos avaliados. Seguindo esse padrão, podemos sugerir que talvez, alguns desses casos em que as lesões estivessem presentes fossem casos que evoluíram para carcinoma a partir dessas lesões e que, portanto perderam a expressão dessa proteína. Outras possibilidades devem ser avaliadas, uma vez que a evolução dos carcinomas vulvares a partir de lesões precursoras é pouco freqüente (JEFFCOATE e WOODCOCK 1961; MEFFERT et al. 1995). A possibilidade de haver relação inversa entre a expressão de p16 e pRb, já averiguada em outros trabalhos (SHAPIRO et al. 1995; YEAGER et al. 1995), inclusive em carcinomas vulvares (CHAN et al. 1998), também não foi encontrada.

As lesões associadas ao carcinoma vulvar também foram as únicas alterações encontradas com relação estatisticamente significativa nas análises de expressão protéica de p53 que apresentou marcação positiva em 53% dos 134 casos avaliáveis, corroborando os achados de outros estudos em carcinomas vulvares que encontraram uma variação na

positividade entre 35% e 68% (MILDE-LANGOSCH e RIETHDORF 1995; KAGIE et al. 1997a; LERMA et al. 1999; SALMASO et al. 2000). O aumento significativo de p53 identificado nos casos em que o carcinoma vulvar apresentou lesões adjacentes não demonstrou relevância para MCCONNELL et al. (1997) que estudaram 115 tumores vulvares com ou sem lesões associadas, portanto esse achado pode ser apenas um reflexo de um mecanismo de *stress* causado por isquemia ou inflamação promovido pelas lesões (LIEGL e REGAUER 2006). Nenhuma outra variável clínica e anátomopatológica apresentou qualquer relação com a expressão de p53, nem mesmo a infecção por HPV ou a sobrevida das mulheres acometidas pelo carcinoma vulvar. Na literatura esses dados são controversos, uma vez que alguns trabalhos corroboram com as constatações aqui apresentadas (KAGIE et al. 1997a e b; MCCONNELL et al. 1997), enquanto outros as refutam (SCHEISTROEN et al. 1999; SALMASO et al. 2000). SCHEISTROEN et al. (1999) demonstraram relação prognóstica somente em tumores mais avançados (FIGO III e IV), enquanto no presente trabalho nenhuma relação foi estabelecida entre a expressão de p53 e o estadiamento tumoral.

A avaliação do *status* gênico revelou uma cópia do gene *TP53* deletada em apenas 6,3% dos casos. Em somente 1 dos 4 casos com deleção houve concomitante ausência de expressão da proteína p53, o que sugere, apesar do pequeno número amostral, que mutações estejam presentes na cópia restante do gene nas amostras p53 positivas conforme proposto por RÖIJER et al. (1997), que observaram padrão semelhante em

carcinomas adenóides císticos. Essa teoria também é sustentada por outros trabalhos que encontraram mutações em *TP53* como alterações freqüentes em carcinomas vulvares (VANIN et al. 2002; OSAKABE et al. 2007; PINTO et al. 2010). Outro fato que corrobora a hipótese proposta por RÖIJER et al. (1997) é redução na expressão de mRNA responsável pela tradução da proteína selvagem observada nas amostras tumorais.

Com função similar à p53 quando representadas pelas isoformas contendo o domínio de transativação (HIBI et al. 2000; ZAIKA et al. 2002), as proteínas p63 e p73 ainda permanecem pouco compreendidas em carcinomas vulvares. Nos casos incluídos nesse estudo a marcação de p63 e p73 foi observada em 50,4% e 68%, respectivamente. Essa marcação compreende as isoformas α e β contendo o domínio de transativação de p73 e a proteína p63 sem a amino-terminal homóloga à p53 ($\Delta Np63$). A expressão concomitante dessas proteínas, bem como de cada uma delas com sua homóloga p53, atingiu relevância estatística. Essa associação sugere que elas atuem simultaneamente e que os mecanismos de auto-regulação entre elas já descrito por outros autores está presente também nos carcinomas vulvares, uma vez que as isoformas que não contêm o domínio de transativação são capazes de regular a atividade das proteínas selvagens (VAN BOKHOVEN e BRUNNER 2002; ZAIKA et al. 2002; PIETSCH et al. 2008).

Em carcinomas vulvares, segundo estudo conduzido por O'NIONS et al. (2001), as principais isoformas de p73 expressas são as do tipo α e γ , portanto as nossas análises cobrem, pelo menos em parte a expressão

preferencial do gene TP73. A expressão aumentada da proteína p73 observada corrobora outros estudos em tumores de mama (ZAIKA et al. 1999), bexiga (CHI et al. 1999), em carcinomas hepatocelulares (TANNAPFEL et al. 1999), em carcinomas biliares extra-hepáticos (HONG et al. 2007) e vulvares (O'NIONS et al. 2001).

Nas análises do transcrito do gene TP73 a expressão também se mostrou elevada. A expressão do mRNA responsável pela codificação da proteína selvagem revelou um aumento significativo nas amostras tumorais quando comparadas às amostras normais. Esse aumento pode ser explicado pelo grande número de casos HPV positivos contidos nas amostras utilizadas para a realização da técnica de qRT-PCR, uma vez que é notória a relação existente entre o aumento de E2F livre e a indução de expressão de p73 (IRWIN et al. 2000; LISSY et al. 2000), bem como o aumento na liberação desse fator de transcrição naqueles casos onde a oncoproteína viral E7 atua sobre pRb (ZUR HAUSEN 2002). Portanto, E2F pode ser o responsável pelo aumento da transcrição de p73 nos carcinomas vulvares. Essa hipótese pode ser confirmada pelo fato de apenas 3 amostras terem apresentado marcação IHQ positiva para pRb entre as amostras avaliadas por qRT-PCR.

A relação entre a expressão de p73 e fatores prognósticos é escassa em carcinomas vulvares, contudo O'NIONS et al. (2001) relacionaram o aumento na sua expressão a graus tumorais mais avançados em carcinomas vulvares assim como TANNAPFEL et al. (1999) que relacionaram-a à progressão do tumor em carcinomas hepáticos. Esses

dados divergem dos nossos achados, uma vez que a marcação de p73 ocorreu preferencialmente nos casos estadiados como FIGO I e II ($p=0,005$). Porém, é importante ressaltar que em carcinomas vulvares a principal isoforma encontrada foi a $\Delta 2p73$ (O'NIONS et al. 2001), que não dispõe do domínio de transativação, e portanto pode desempenhar um papel anti-apoptótico, inibindo a proteína p73 selvagem além da p53 (FILLIPOVICH et al. 2001). No presente estudo, o anticorpo utilizado permitiu a avaliação da proteína contendo o domínio de transativação, e portanto a expressão elevada nos carcinomas vulvares menos avançados era esperada, uma vez que mutações no gene TP73, assim como no TP63, não são achados freqüentes em cânceres (YOSHIKAWA et al. 1999).

A mesma relação encontrada entre p73 e o estadiamento foi observada para a expressão de p63; no entanto, esse dado é conflitante com o fato da proteína marcada nesse trabalho não conter a porção aminoterminal, responsável pelo papel supressor de tumor (VAN BOKHOVEN e BRUNNER 2002).

O estadiamento da doença não reflete no diagnóstico anátomo-patológico diretamente, portanto carcinomas vulvares estadiados como FIGO I e II podem ser representados por tipos histológicos menos diferenciados, os quais normalmente possuem maior expressão de p63 (ZAIKA e EL-RIFAI 2006). No presente estudo não foi possível obter relação estatística significativa com os grupos histológicos isolados ou unindo-os em grupos contendo os subtipos menos e mais diferenciados. Tampouco foi observado pior prognóstico naquelas pacientes com alteração na expressão

de p63 conforme já foi visto em tumores cervicais (CHO et al. 2003), carcinomas de cabeça e pescoço (LO MUZIO et al. 2005), de bexiga (PARK et al. 2000) e ovário (MARCHINI et al. 2007).

Em princípio a ausência de correlação significaria um mecanismo anti-tumoral produzido por Δ Np63, uma vez que somente essa variante é reconhecida pelo anticorpo utilizado; contudo, como não foi feita a verificação da presença concomitante de outras variantes, não se pode afirmar que Δ Np63 não desempenhe o mesmo papel pró-tumoral observado em outros tumores (MARCHINI et al. 2007). Outro fator relevante a ser considerado para a falta de relação com pior prognóstico é a provável ação anti-tumoral da proteína Δ Np63 descrita por DOHN et al. (2001), uma vez que ela pode conter um domínio de transativação secundário suficiente para promover a seus efeitos supressores de tumor. Essa última sugestão pode ser inferida nos resultados do presente estudo uma vez que a expressão de Δ Np63 obteve correlação estatística com a da proteína pRb ($p=0,0182$). A relação entre ambas não é direta, porém a interferência nas proteínas do ciclo celular promovida por Δ Np63 sem o domínio de transativação secundário pode afetar o grau de fosforilação de pRb (VAN BOKHOVEN e BRUNNER 2002).

A falta de relação prognóstica também foi verificada em outra proteína ainda não descrita em carcinomas vulvares, a BRCA1. Essa proteína é considerada supressora tumoral principalmente por apresentar importante papel na recombinação homóloga frente a danos no DNA (WANG et al. 2001). Sua associação com processos tumorais é bem descrita em

carcinomas da mama e ovário, por mutações germinativas ou esporádicas, que levam à perda de sua expressão (ESTEVEZ et al. 2009; AL-MULLA et al. 2009). A alteração na expressão dessa proteína também é relacionada à resistência à quimioterapia (QUINN et al. 2003). Em carcinomas de pulmão do tipo não-pequenas células, a expressão de BRCA1 foi observada em 93% dos casos avaliados (WACHTERS et al. 2005) corroborando os achados do presente estudo, em que 93,8% das amostras foram positivas para BRCA1. Assim como descrito por WACHTERS et al. (2005) em tumores de pulmão, e por VORA et al. (2003) em carcinomas da língua sem separação por estadios clínicos, nenhuma relação com a sobrevida das pacientes foi observada, demonstrando que a expressão de BRCA1 sozinha não é ser um bom marcador prognóstico em carcinomas vulvares. Outro fator que favorece essa constatação é a ausência de relação estatisticamente significativa entre a expressão dessa proteína com qualquer variável clínica e anátomo-patológica.

BRCA1 está envolvida em diversos processos celulares, portanto, mesmo apresentando importante função no reparo ao DNA (WACHTERS et al. 2005), essa pode não ser a função predominante nos carcinomas vulvares, visto que nenhuma alteração foi percebida na análise do seu mRNA quando comparada as amostras de tecido normal com as amostras de tecido tumoral ($p=0,53$).

Assim como BRCA1, mutações germinativas no gene *PTEN* estão associadas a tumores hereditários como os de mama e tireóide (CRISTOFANO e PANDOLFI 2000), porém vários relatos também

descrevem mutações somáticas relacionando-as a melanomas, tumores de mama, endométrio, cabeça e pescoço e carcinomas vulvares (TSAO et al. 1998; SHAO et al. 1998; PERREN et al. 1999; MUTTER et al. 2000; HOLWAY et al. 2000). A expressão protéica de PTEN, no entanto, pode ser alterada por outros mecanismos além de mutações, tais como hipermetilação do seu promotor, *splicings* alternativos do pré mRNA e modificações pós-traducionais (LEE et al. 2001). As expressões gênica e protéica de *PTEN* no presente estudo demonstraram baixa expressão nos carcinomas vulvares. Em relação ao mRNA a expressão foi mais de quatro vezes menor nas amostras tumorais quando comparadas às amostras normais ($p < 0,0001$), e esse decréscimo foi corroborado pelas análises imuno-histoquímicas das amostras tumorais avaliadas por qRT-PCR que apresentaram grande número de amostras sem qualquer marcação para PTEN. Além disso, somente 14% do total de casos avaliados no presente estudo para avaliação protéica apresentaram positividade para PTEN, um número bem abaixo dos já descritos em tumores de língua (71%) (LEE et al. 2001), de pulmão (76%) (SORIA et al. 2002) e de laringe (82%) (SULLU et al. 2010). No entanto, em adenocarcinomas de endométrio (MUTTER et al. 2000), em neoplasias hematológicas (DAHIA et al. 1999) e em carcinomas de pênis (STANKIEWICZ et al. 2011), foi observada perda de expressão de PTEN em mais de 50% dos casos avaliados, demonstrando que as discrepâncias observadas podem ser atribuídas às particularidades teciduais e à mecanismos de inativação da transcrição gênica ou tradução protéica. Apesar dessa alteração marcante na expressão de PTEN nos carcinomas

vulvares não foi possível estabelecer nenhuma relação com fatores prognósticos já instituídos em outros tumores como a associação positiva com o grau tumoral (SQUARIZE et al. 2002; STANKIEWICZ et al. 2011), com a ausência de metástases e com melhor sobrevida (LEE et al. 2001).

No intuito de verificar um possível mecanismo pelo qual ocorreu a diminuição de expressão protéica de PTEN nos carcinomas vulvares foi realizada a avaliação do *status* gênico que verificou deleção somente em 3% dos casos avaliados, corroborando os achados em carcinomas de pênis obtidos por STANKIEWICZ et al. (2011) que encontraram deleções em apenas 4% dos casos. Essa informação, associada aos dados obtidos a partir da avaliação do mRNA de PTEN sugere que os mecanismos pelos quais ocorreu a diminuição na expressão protéica estão ligados à transcrição gênica, provavelmente à metilação no promotor do gene conforme sugerido por SORIA et al. (2002).

7 CONCLUSÕES

A expressão das proteínas p16, p21, p27, p53, p63, pRb, PTEN e BRCA1 não representam, até o momento, valiosos marcadores prognósticos em carcinomas vulvares. Por outro lado, a expressão de p14 esta associada a casos com pior prognóstico, enquanto a expressão de p73 é sugestiva de melhor prognóstico em carcinomas vulvares.

Nesse contexto pacientes com tumores p14 positivos apresentaram recidivas mais precocemente e também evoluíram para óbito mais rápido quando comparadas às mulheres com tumores p14 negativos, enquanto a expressão de p73 está ligada à casos estadiados mais precocemente e com menores taxas de metástase linfonodal.

O *status* gênico de *PTEN* e *TP53* não aparece como fator determinante ou de grande relevância para a carcinogênese vulvar.

A expressão dos genes *CDKN2A*(p16), *CDKN1A*, *TP53*, *TP73*, *CDKN2A*(p14), *RB*, *PTEN* e *BRCA1* necessita de estudos complementares e mais amplos para que seja estabelecida a relevância da mesma nos carcinomas vulvares.

A infecção por HPV se mostrou freqüente e similar à observada em outros trabalhos, assim como o tipo infectante mais comum, o HPV16. No entanto a infecção por HPV não representou nenhum valor prognóstico para o carcinoma vulvar.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:400-14.

Al-Mulla F, Bland JM, Serratt D, et al. Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. **J Clin Pathol** 2009; 62:350-6.

[ACS] American Cancer Society. **Cancer reference information**. Disponível em: <URL:<http://www.cancer.org>> [2011 jun 06]

Basta A, Adamek K, Pityński K. Intraepithelial neoplasia and early stage vulvar cancer: epidemiological, clinical and virological observations. **Eur J Gynaecol Oncol** 1999; 20:111-4.

Betticher DC, Heighway J, Thatcher N, et al. Abnormal expression of CCND1 and RB1 in resection margin epithelia of lung cancer patients. **Br J Cancer** 1997; 75:1761-8.

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

Brandenberger AW, Rüdlinger R, Hänggi W, et al. Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma: a study by in situ hybridisation. **Arch Gynecol Obstet** 1992; 252:31-5.

Chan MK, Cheung TH, Chung TK, et al. Expression of p16INK4 and retinoblastoma protein RB in vulvar lesions of Chinese women. **Gynecol Oncol** 1998; 68:156-61.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, et al. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. **Cell** 1991; 65:1053-61.

Chi S-G, Chang S-G, Lee S-J, et al. Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer. **Cancer Res** 1999; 59:2791-3.

Cho NH, Kim YB, Park TK, et al. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. **Gynecol Oncol** 2003; 91:346-53.

Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:253-67.

Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, et al. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effect with p53. **Cancer Res** 1998; 58:1090-4.

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

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

Cristofano AD, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell** 2000; 100:387-90.

Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, et al. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. **Hum Mol Genet** 1999; 8:185-93.

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

de Hullu JA, van der Avoort IA, Oonk MH, van der Zee AG. Management of vulvar cancers. **Eur J Surg Oncol** 2006; 32:825-31.

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

De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, et al. Two new splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. **J Exp Med** 1998; 188:1763–8.

Denny L, Ngan HYS. Section B: Malignant manifestations of HPV infection carcinoma of the cervix, vulva, vagina, anus, and penis. **Int J Obstet Gynecol** 2006; 94:S50–5.

Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. **Oncogene** 2007; 26:5169-83.

Ding PR, An X, Cao Y, et al. Depth of tumor invasion independently predicts lymph node metastasis in T2 rectal cancer. **J Gastrointest Surg** 2011; 15:130-6.

Dittmer C, Katalinic A, Mundhenke C, et al. Epidemiology of vulvar and vaginal cancer in Germany. **Arch Gynecol Obstet** 2011; 284:169-74.

Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. **Oncogene** 2001; 20:3193-205.

Du W, Pogoriler J. Retinoblastoma family genes. **Oncogene** 2006; 25:5190–200.

ERBer R, Klein W, Andl T, et al. Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. **Int J Cancer** 1997; 74:383–9.

Esteves VF, Thuler LC, Amêndola LC, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2009; 42:453-7.

Fillipovich I, Sorokina N, Gatei M, et al. Transactivationdeficient p73alpha (p73 Delta exon2) inhibits apoptosis and competes with p53. **Oncogene** 2001; 20:514-22.

Ford D, Easton DF, Bishop DT, et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **Lancet** 1994; 343:692-5.

Galli P, Cadoni G, Volante M, et al. A case-control study on the combined effects of p53 and p73 polymorphisms on head and neck cancer risk in an Italian population. **BMC Cancer** 2009; 9:137.

Goberdhan D, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. **Hum Mol Genet** 2003; 12:239-48.

Gunver S, Kienle, GS, Glockmann A, et al. Viscum album L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. **J Exp Clin Cancer Res** 2009; 28:79.

Haber DA. Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19ARF. **Cell** 1997; 91:555-8.

Hibi K, Trink B, Patturajan M, et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:5462-7.

Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, et al. Snail-Induced Down-regulation of Δ Np63A Acquires Invasive Phenotype of Human Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Res** 2007; 67:9207-13.

Hoevenaars BM, van dA, I, de Wilde PC, et al. A panel of p16(INK4A), MIB1 and p53 proteins can distinguish between the 2 pathways leading to vulvar squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 123:2767-73.

Holway AH, Rieger-Christ KM, Miner WR, et al. Somatic Mutation of PTEN in Vulvar Cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3228-35.

Hong SM, Cho H, Moskaluk CA, et al. p63 and p73 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and their clinical significance. **J Mol Histol** 2007; 38:167-75.

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

Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:824-42.

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

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

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, et al. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. **Nature** 2000; 407:645-8.

Ito S, Ohga T, Saeki H, et al. Promoter hypermethylation and quantitative expression analysis of CDKN2A (p14ARF and p16INK4a) gene in esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2007; 27:3345-53.

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

Jares P, Rey MJ, Fernandez PL, et al. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumor proliferation and oestrogen receptor status. **J Pathol** 1997; 182:160-6.

Jeffcoate TN, Woodcock AS. Premalignant conditions of the vulva, with particular reference to chronic epithelial dystrophies. **Br Med J** 1961; 2:127-34.

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

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

Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, et al. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. **Obstet Gynecol** 2006; 107:1018-22.

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

Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, et al. p53 protein overexpression, a frequent observation in squamous cell carcinoma of the vulva and in various synchronous vulvar epithelia, has no value as a prognostic parameter. **Int J Gynecol Pathol** 1997b; 16:124-30.

Kim D, Jung W, Koo JS. The expression of ERCC1, RRM1, and BRCA1 in breast cancer according to the immunohistochemical phenotypes. **J Korean Med Sci** 2011; 26:352-9.

Klemba A, Kukwa W, Semczuk A, et al. Vulvar cancer as a target for molecular medicine. **Front Biosci (Schol Ed)** 2011; 3:136-44.

Knopp S, Bjorge T, Nesland JM, et al. p16INK4a and p21Waf1/Cip1 expression correlates with clinical outcome in vulvar carcinomas. **Gynecol Oncol** 2004; 95:37-45.

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

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

Koga F, Kawakami S, Fujii Y, Saito K, Ohtsuka Y, Iwai A et al. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. **Clin Cancer Res** 2003; 9:5501-7.

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

Kwong RA, Kalish LH, Nguyen TV, et al. p14ARF protein expression is a predictor of both relapse and survival in squamous cell carcinoma of the anterior tongue. **Clin Cancer Res** 2005; 11:4107-16.

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

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15–6.

Lanneau GS, Argenta PA, Lanneau MS, Riffeburgh, et al. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. **Am J Obstet Gynecol** 2009; 200:645.e1-5.

Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. **Exp Mol Med** 2009; 41:765-71.

Lee JI, Soria JC, Hassan KA, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2001; 127:1441-5.

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

Leibowitch M, Neill S, Pelisse M, et al. The epithelial changes associated with squamous cell carcinoma of the vulva: a review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. **Br J Obstet Gynaecol** 1990; 97:1135-9.

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

Lerma E, Esteller M, Herman JG, et al. Alterations of the p16/RB/cyclin-D1 pathway in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and lichen sclerosus. **Hum Pathol** 2002; 33:1120-5.

Li G, Liu Z, Sturgis EM, et al. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis** 2005; 26:1596-602.

Liegl B, Regauer S. p53 immunostaining in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN). **Histopathology** 2006; 48:268-74.

Lin MC, Lomo L, Baak JP, Eng C, Ince TA, Crum CP et al. Squamous morules are functionally inert elements of premalignant endometrial neoplasia. **Mod Pathol** 2009; 22:167-74.

Lissy NA, Davis PK, Irwin M, et al. A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. **Nature** 2000; 407:642-5.

Lloyd AC. Access: p53: only ARF the story. **Nat Cell Biol** 2000; 2:E48-50.

Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, et al. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Hum Pathol** 2005; 36:187-94.

Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem** 1998; 273:13375-8.

Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. **Annu Rev Biochem** 2001; 70:247–79.

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.

Marchini S, Marabese M, Marrazzo E, et al. DeltaNp63 expression is associated with poor survival in ovarian cancer. **Ann Oncol** 2008; 19:501-7.

McCluggage WG. Recent developments in vulvovaginal pathology. **Histopathology** 2009; 54:156-73.

McConnell DT, Miller ID, Parkin DE, et al. p53 protein expression in a populationbased series of primary vulval squamous cell carcinoma and immediate adjacent field change. **Gynecol Oncol** 1997; 67:248-54.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA: 2008.

Meffert JJ, Davis BM, Grimwood RE. Lichen sclerosis. **J Am Acad Dermatol** 1995; 32:393-416; quiz 417-8.

Messing MJ, Gallup DG. Carcinoma of the vulva in young women. **Obstet Gynecol** 1995; 86:51-4.

Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of Cell-Cycle Regulatory Proteins in Gynecological Cancer. **J Cell Physiol** 2003; 196:224–44.

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

Morris EJ, Dyson NJ. Retinoblastoma protein partners. **Adv Cancer Res** 2001; 82:1-54.

Mousses S, Ozçelik H, Lee PD, et al. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. **Hum Mol Genet** 1995; 4:1089-92.

Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. **Cell Death Differ** 2006; 13:962–72.

Mutter GL, Lin M-C, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:924-30.

Myers MP, Pass I, Batty IH, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:13513-8.

[NCI] National Cancer Institute. National Institutes of Health. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER). **Estimated new cancer cases and deaths for 2009.** Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/results_single/sect_01_table.01.pdf> [2011 set 12]

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1027>> [2011 set 12]

[NIEHS] National Institute of Environmental Health Sciences. **Environmental genome projects.** USA: NIEHS; 2004.

Nogueira MC, Guedes Neto EP, Rosa MW, et al. Immunohistochemical expression of p16 and p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva. **Pathol Oncol Res** 2006; 12:153-7.

O'Nions J, Brooks LA, Sullivan A, et al. p73 is over-expressed in vulval cancer principally as the Delta 2 isoform. **Br J Cancer** 2001; 85:1551–6.

Osakabe M, Hayashi M, Katayama Y, et al. Characteristics of vulvar squamous cell carcinoma in Japanese women. **Pathol Int** 2007; 57:322-7.

Park BJ, Lee SJ, Kim JI, et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. **Cancer Res** 2000; 60:3370-4.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL. **Cancer incidence in five continents, Vol. VI.** Lyon: IARC 1992. (Scientific Publications; nº 120).

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

Perren A, Weng LP, Boag AH, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. **Am J Pathol** 1999; 155:1254-60.

Peschos D, Stefanou D, Vougiouklakis T, et al. Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferation and prognosis. **J Exp Clin Cancer Res** 2005; 24:431-7.

Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, et al. The p53 family and programmed cell death. **Oncogene** 2008; 27:6507-21.

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

Pinto AP, Schlecht NF, Pintos J, et al. Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. **Gynecol Oncol** 2004; 92:856-65.

Pinto AP, Miron A, Yassin Y, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia contains TP53 mutations and is genetically linked to vulvar squamous cell carcinoma. **Mod Pathol** 2010; 23:404-12.

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.

Plass C. Cancer epigenomics. **Hum Mol Genet** 2002; 11:2479-88.

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell** 1998; 92:713-23.

Prempre T, Amornmarn R. Radiation treatment of recurrent carcinoma of the vulva. **Cancer** 1984; 54:1943-9.

Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res** 2003; 63:6221-8.

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

Röijer E, Dahlenfors R, Mark J, et al. Observations by chromosome banding, FISH and immunohistochemistry in an adenoid cystic carcinoma with del(17)(p13) as the sole deviation. **Virchows Arch** 1997; 430:339-42.

Rolfe KJ, Crow JC, Benjamin E, et al. Cyclin D1 and retinoblastoma protein in vulvar cancer and adjacent lesions. **Int J Gynecol Cancer** 2001; 11:381-6.

Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumourpromoting activities of stromal fibroblasts. **Cancer Lett** 2002; 179:1-14.

Rufforny I, Wilkinson EJ, Liu C, et al. Human papillomavirus infection and p16(INK4a) protein expression in vulvar intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. **J Low Genit Tract Dis** 2005; 9:108-13.

Salmaso R, Zen T, Zannol M, et al. Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. **Eur J Gynaecol Oncol** 2000; 21:479-83.

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

Saraiya M, Watson M, Wu X, et al. Incidence of in situ and invasive vulvar cancer in the US, 1998-2003. **Cancer** 2008; 113(10 Suppl):2865-72.

Schabath MB, Wu X, Wei Q, Li G, Gu J, Spitz MR: Combined effects of the p53 and 73 polymorphisms on lung cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15:158-61.

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

Scheistroen M, Trope C, Pettersen EO, Nesland JM. p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the vulva. **Cancer** 1999; 85:1133-8.

Shao X, Tandon R, Samara G, et al. Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 1998; 77:684-8.

Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, et al. Reciprocal RB inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. **Cancer Res** 1995; 55:505-9.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev** 1999; 13:1501-12.

Soria JC, Lee HY, Lee JI, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1178-84.

Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto D Jr. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:379-84.

Stankiewicz E, Prowse DM, Ng M, et al. Alternative HER/PTEN/Akt pathway activation in HPV positive and negative penile carcinomas. **PLoS One** 2011; 6:e17517.

Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. **EMBO J** 1998; 17:5001-14.

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

Sullu Y, Gun S, Atmaca S, Karagoz F, Kandemir B. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx. **Diagn Pathol** 2010; 5:35.

Tannapfel A, Wasner M, Krause K, et al. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1154-8.

Tringler B, Grimm C, Dudek G, et al. p16INK4a expression in invasive vulvar squamous cell carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2007; 15:279–83.

Tsao HS, Zhang X, Benoit E, Haluska FG. Identification of PTEN/MMAC 1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. **Oncogene** 1998; 16:3397-402.

Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, Shimotohno K. New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. **Oncogene** 1999; 18:4993-8.

Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Nozoe T et al. Expression of the p53 family in lung cancer. **Anticancer Res** 2006; 26:1785-90.

van Bokhoven H, Brunner HG. Splitting p63. **Am J Hum Genet** 2002; 71:1-13.

van der Avoort I, Shirango H, Hoevenaars BM, et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. **Int J Gynecol Pathol** 2006; 25:22-9.

van Oijen MG, Tilanus MG, Medema RH, Slootweg PJ. Expression of p21 (Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. **J Oral Pathol Med** 1998; 27:367-75.

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

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

Vervoorts J, Lüscher B. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). **Cell Mol Life Sci** 2008; 65:3255-64.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Choksi TJ. BRCA1 expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue. **J Surg Oncol** 2003; 83:232-40.

Wachters FM, Wong LS, Timens W, Kampinga HH, Groen HJ. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. **Lung Cancer** 2005; 50:211-9.

Wang H, Zeng ZC, Bui TA, et al. Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. **Cancer Res** 2001; 61:270-7.

Watson M, Saraiya M, Wu X. Update of HPV-associated female genital cancers in the United States, 1999-2004. **J Womens Health (Larchmt)** 2009; 18:1731-8.

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

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature** 1993; 366:701-4.

Yamazaki K, Hasegawa M, Ohoka I, et al. Increased E2F-1 expression via tumour cell proliferation and decreased apoptosis are correlated with adverse prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. **J Clin Pathol** 2005; 58:904-10.

Yates F. Contingency table involving small numbers and the χ^2 test. **Suppl J Royal Stat Soc** 1934; 1:217–35.

Yeager T, Stadler W, Belair C, et al. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. **Cancer Res** 1995; 55:493-7.

Yoshikawa H, Nagashima M, Khan MA, et al. Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. **Oncogene** 1999; 18:3415-21.

Zaika AI, Kovalev S, Marchenko ND, et al. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. **Cancer Res** 1999; 59:3257-63.

Zaika AI, Slade N, Erster SH, et al. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. **J Exp Med** 2002; 196:765-80.

Zaika AI, El-Rifai W. The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. **Cell Death Differ** 2006; 13:935-40.

Zamparelli A, Masciullo V, Bovicelli A, et al. Expression of cell-cycle-associated proteins pRb2/p130 and p27kip in vulvar squamous cell carcinomas. **Hum Pathol** 2001; 32:4-9.

Zhang Y, Xiong Y, YaRBrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the RB and p53 tumor suppression pathways. **Cell** 1998; 92:725-34.

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

Anexo 1 - Estadiamento FIGO (2009) para os carcinomas vulvares.

ESTADIAMENTO DO CARCINOMA VULVAR	
Estadiamento FIGO	Características do tumor
0	Carcinoma in situ (carcinoma pré-invasivo)
I	Tumor confinado a vulva ou vulva e períneo, 2 cm ou menos em sua maior dimensão
IA	Tumor confinado à vulva ou períneo, ≤ 2 cm de tamanho, com invasão do estroma ≤ 1 mm e linfonodos negativos *
IB	Tumor confinado à vulva ou períneo, > 2 cm de tamanho ou com invasão do estroma > 1 mm e linfonodos negativos *
II	Tumor de qualquer tamanho com propagações adjacentes (uretra inferior, vagina, ânus) e linfonodos negativos
IIIA	Tumor de qualquer tamanho com linfonodos inguino-femorais positivos: uma metástase linfonodal ≥ 5 mm ou 1-2 metástases linfáticas < 5 mm
IIIB	Tumor de qualquer tamanho com 2 ou mais metástases linfonodais ≥ 5 mm ou 3 ou mais metástases linfonodais > 5 mm
IIIC	Tumor de qualquer tamanho com linfonodo(s) positivo(s) com propagação extracapsular
IVA	Tumor invade qualquer das seguintes estruturas: mucosa da bexiga, mucosa retal, mucosa uretral superior, ou fixado ao osso e / ou metástases regionais bilaterais
IVB	IVB Qualquer metástase distante incluindo linfonodos pélvicos

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

Anexo 2 - Produção Científica Vinculada à Dissertação

A Trabalhos publicados em congressos

Lavorato-Rocha AM, Maia BM, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Cestari FM, Baiocchi G, Guimarães G, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. Role of p53-family members in vascular invasion, perineural invasion and lymph node metastasis in vulvar squamous cell carcinoma. In: **XIV Jornada Internacional de patologia investigativa** 2011, São Paulo.

Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, Maia BM, Stiepcich MM, Cestari FM, Baiocchi G, Guimarães G, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. Relevance of p16 expression and HPV infection in vulvar carcinoma. In: **XXVII Congresso Brasileiro de Patologia e XXVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de patología** 2011, Maceió.

Rodrigues IS, **Lavorato-Rocha AM**, Maia BM, Stiepcich MM, Cestari FM, Baiocchi G, Guimarães G, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. Identificação molecular dos subtipos virais de papiloma humano encontrados em carcinomas de vulva e sua associação com fatores prognósticos da doença. In: **XIV Jornada Internacional de patologia investigativa** 2011, São Paulo.

Baiocchi G, Cestari FM, Cestari LA, Rocha RM, Faloppa CC, Oliveira RAR, Fukazawa EM, Kumagai IY, Badiglian-Filho I, Maia BM, Rodrigues IS, **Lavorato-Rocha AM**, Guimarães G, Soares FA. Role of number of resected and metastatic lymph nodes in vulvar cancer. In: **17 Congress of the European Society of Gynecologic Oncology** 2011, Milão.

Baiocchi G, Cestari FM, Cestari LA, Rocha RM, Faloppa CC, Oliveira RAR, Fukazawa EM, Kumagai IY, Badiglian-Filho I, Maia BM, Rodrigues IS, **Lavorato-Rocha AM**, Guimarães G, Soares FA. Pelvic lymph node metastasis in: vulvar cancer. In: **17 Congress of the European Society of Gynecologic Oncology** 2011, Milão.

Baiocchi G, Cestari FM, Cestari LA, Rocha RM, Faloppa CC, Oliveira RAR, Fukazawa EM, Kumagai IY, Badiglian-Filho I, Maia BM, Rodrigues IS, **Lavorato-Rocha AM**, Guimarães G, Soares FA. Patterns of inguinal lymph node metastasis in patients with vulvar cancer. In: **17 Congress of the European Society of Gynecologic Oncology** 2011, Milão.

B Artigos submetidos para Periódicos

Lavorato-Rocha AM, Maia BM, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Cestari FM, Baiocchi G, Guimaraes G, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. Molecular aspects of vulvar carcinoma – Artigo de revisão submetido à revista **Pathology Research and Practice**.

Maia BM, Cestari FM, Baiocchi G, **Lavorato-Rocha AM**, Rodrigues IS, Guimaraes G, Vassallo J, Stiepcich MM, Soares FA, Rocha RM. Characterization of socio-demographic and clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma – Artigo submetido à revista **Cancer Investigation**.

C Artigos em fase de submissão

p14 as a prognostic marker in vulvar carcinoma – Artigo em fase de escrita

Anexo 3 - Próximos Passos

Em cânceres vulvares são poucos os dados a respeito das variações de cópias genômicas. Estas podem favorecer a carcinogênese uma vez que a aquisição ou perda de cópias do DNA podem atingir *locus* de oncogenes ou genes supressores tumorais, respectivamente. Portanto iremos realizar uma análise em larga escala do genoma de mulheres afetadas pelo carcinoma vulvar utilizando a metodologia de Hibridação Genômica Comparativa (CGH) em *array* que detecta variações no número de cópias do DNA. Também iremos avaliar o perfil de expressão gênica desses tumores em análise de larga escala para integrar os dados e tentar identificar regiões do DNA com variações no número de cópias e genes diferencialmente expressos, buscando encontrar genes candidatos para determinar melhores e mais acurados valores prognósticos no carcinoma vulvar.