

**ALTERAÇÕES EM ONCOGENES EM CARCINOMA DE
VULVA: CORRELAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS ANATOMO-PATOLÓGICOS, DADOS
CLÍNICOS E INFECÇÃO POR HPV**

BEATRIZ DE MELO MAIA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

Co-orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Maia, Beatriz de Melo

Alterações em oncogenes em carcinoma de vulva: correlação com fatores prognósticos anatomo-patológicos, dados clínicos e infecção por HPV / Beatriz de Melo Maia – São Paulo, 2011.

185p.

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 PAPILOMAVÍRUS. 3. ONCOGENES. 4. PROGNÓSTICO.

*“A ciência realmente só tem alcançado
tornar
mais intensa e forte uma certeza: a velha
certeza socrática da nossa irreparável
ignorância. De que cada vez sabemos mais -
que não sabemos nada”.*

Eça de Queirós – Notas Contemporâneas

DEDICATÓRIA

A minha mãe, minha melhor amiga e exemplo constante de perseverança, estímulo, dedicação e fé.

Ao meu querido pai, homem íntegro, fonte de orgulho, por seu apoio em todos os sentidos e por me mostrar que nada é impossível.

A ambos pelo exemplo de família.

A toda a minha grande família, meus queridos avós e amigos pela presença, mesmo na distância.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Rafael Malagoli Rocha, meu orientador e idealizador deste projeto, pela confiança e pela oportunidade ímpar de tornar possível o sonho do meu mestrado.

Ao meu co-orientador Dr. Emmanuel Dias-Neto e às pesquisadoras Dra. Diana Nunes e Dra. Kátia Carvalho pelas ricas discussões acerca do andamento e dos planos futuros para o projeto.

Ao Hospital A.C. Camargo pelo acolhimento, às instituições de fomento à pesquisa CAPES pelo fornecimento de bolsa de estudos, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos os meus companheiros de jornada André Mourão e Iara Buzzo, e todos os colegas de iniciação científica, mestrado, doutorado, Pós-Doc e demais pesquisadores e alunos do CIPE e da Pós-Graduação por tornar a caminhada diária mais prazerosa.

A Dra. Mônica Stiepcich pela revisão incansável das lâminas e pelas sugestões sempre construtivas.

Aos membros do departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo: Dr. Fernando Augusto Soares, Dr. José Vassallo.

A Dra. Aline Damascena e Dr. Carlos Bragança pelo apoio estatístico.

Ao Ivan Neves e todas as funcionárias do setor de imunoistoquímica pelo auxílio e apoio sempre constantes na imuno e no FISH. Ao Severino e Carlinhos pelo zelo com as lâminas e TMAs e ao Dr. Rômulo com a colméia.

Ao Departamento de Ginecologia e Cirurgia pélvica pelo suporte neste trabalho: Dr. Glauco Baiocchi, Dra. Flávia Munhoz e Dr. Gustavo Guimarães.

Ao Arquivo de Anatomia: Fábio, Glauber e Emília, pelo apoio com os blocos de parafina.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Comitê de Ética em Pesquisa, Biobanco, SAME e Biblioteca, os meus agradecimentos.

Agradeço, ainda, a todas as pacientes que, de forma indireta, foram responsáveis para a realização deste projeto.

RESUMO

Maia BM. **Alterações em oncogenes em carcinoma de vulva: correlação com fatores prognósticos anatomo-patológicos, dados clínicos e infecção por HPV.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O carcinoma de vulva é um tumor maligno raro que se apresenta mais comumente sob a forma de Carcinoma Epidermóide, representando 90% dos tumores vulvares. Trata-se de uma neoplasia que abrange cerca de 3 a 5% dos tumores malignos do trato genital feminino. O interesse médico por este tipo de carcinoma se acentuou na última década, dado o reconhecimento da crescente incidência da doença, e pelo fato do conhecimento existente das alterações moleculares neste tipo de tumor ser, ainda, extremamente limitado. **OBJETIVOS:** Avaliar alterações genômicas e expressão protéica dos oncogenes HER-2, EGFR, c-KIT, c-MYC, n-MYC, NDRG-1, buscando correlacioná-las com a presença de infecção por HPV para a determinação de valores prognósticos em carcinomas de vulva. **MÉTODOS:** Foram selecionados 139 casos de carcinomas de vulva dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo para a construção de microarranjos de tecido (TMAs). Foram avaliadas alterações em oncogenes e em NDRG-1 através de técnicas de imunistoquímica e FISH, correlacionadas aos dados clínicos das pacientes obtidos de seus prontuários clínicos médicos, tais como: sobrevida, acometimento linfonodal, metástase e recidiva, dentre outros, além da associação com fatores prognósticos bem estabelecidos em anatomia patológica (gradação histológica, estadiamento FIGO). Os achados de imunistoquímica foram, ainda, comparados com os resultados obtidos pela avaliação gênica por FISH. **RESULTADOS:** Dados epidemiológicos levantados e positividade de HPV em cerca de 40% das amostras foram muito semelhantes ao citado na literatura. Em relação aos oncogenes

avaliados, nosso estudo mostrou um dado inédito na literatura a respeito da correlação de 100% entre o FISH e a IIQ para HER-2 e EGFR. Um pequeno número de casos com hiperexpressão destes receptores foi observado. Positividade da marcação de EGFR foi correlacionada com nível de significância estatístico marginal ($p=0,08$), com estadios mais avançados da doença. Já a positividade de c-KIT, também com nível de significância marginal, mostrou uma tendência de melhor sobrevida ($p=0,08$) e ausência de lesões associadas ao tumor, tais como presença de carcinoma *in situ*, VINs (usuais ou diferenciadas), acantose vulvar e líquen escleroso ($p=0,09$). Esta positividade também foi correlacionada com infecção pelo HPV com nível estatístico marginal ($p=0,08$). Positividade de c-MYC foi correlacionada com maior potencial invasor da doença ($p=0,03$). Já a positividade de NDRG-1 mostrou tendência de pior prognóstico. A avaliação de n-MYC não mostrou associações relevantes. **CONCLUSÕES:** Em carcinomas de vulva, parece haver indicativos de uma possível tendência de pior prognóstico dos tumores com marcação positiva de HER-2 e NDRG-1, de melhor prognóstico para tumores positivos para c-KIT e que EGFR pode estar relacionado à progressão da doença e c-MYC ao potencial de invasão do tumor. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel destes marcadores nos tumores vulvares.

SUMMARY

Maia BM. [Oncogenes alterations in vulvar carcinoma: correlation with prognostic factors, clinical data and HPV infection]. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Vulvar carcinoma is a rare malignant tumor that presents most commonly as squamous cell carcinoma, representing 90% of vulvar tumors. It is a neoplasm that comprises about 3-5% of female genital tract malignant tumors. The medical interest in this type of carcinoma was accentuated in the last decade due to the recognition of the increasing incidence of the disease and because of the limited existing knowledge of the molecular alterations in this type of tumor. **AIM:** To evaluate genomic alterations and protein expression of the oncogenes HER-2, EGFR, c-KIT, c-MYC, n-MYC, NDRG-1, seeking to correlate these changes with the presence of infection of HPV in order to determine its prognostic importance of the vulvar neoplasms. **METHODS:** One hundred and thirty-nine cases of vulvar carcinomas were selected from the Anatomic Pathology department, Hospital AC Camargo to construct the tissue microarrays (TMAs). Changes in oncogenes and NDRG-1 were evaluated by immunohistochemistry and FISH and these changes were correlated with clinical data of patients, obtained from medical records, such as survival, lymph node involvement, metastases and recurrence, among others, in addition to association with well-established prognostic factors in anatomic pathology (histological grade and FIGO staging). The immunohistochemical findings were also compared with the results obtained by FISH. **RESULTS:** The epidemiologic data evaluated and HPV positivity observed in about 40% of the samples were similar to those results reported on the literature. In relation to the oncogenes evaluated in the present study, our results showed a novel data on the literature regarding the 100% correlation between FISH and IHC for HER-2 and EGFR. A small number of cases with overexpression of these receptors

was observed. EGFR positivity was associated (with marginal level of statistic significance, $p=0,08$) with advanced stages of the disease. The positivity of c-KIT with marginal level of significance was correlated with better survival ($p=0,08$) and absence associated lesions ($p=0,09$). This positivity was also correlated with HPV infection, but with marginal statistical significance ($p=0,08$). c-MYC positivity was correlated with invasion potential of the tumor ($p=0,03$). NDRG-1 positivity showed a trend of association with worse prognosis. **CONCLUSIONS:** Our findings indicate that, in vulvar carcinoma, tumors stained positively for HER-2 and NDRG-1 seem to be an indicative of poor prognosis and tumors stained for c-KIT seem to have better prognosis for vulvar cancer, whereas EGFR may be associated with tumor progression and c-MYC with tumor invasion. However, further studies are needed to elucidate the role of these markers in vulvar carcinomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos principais mecanismos de ativação oncogênica.....	24
Figura 2	Receptores da família ERBB, suas particularidades e ligantes.....	26
Figura 3	Principais vias ativadas pelos receptores da família ERBB e seus efeitos na carcinogênese.....	28
Figura 4	Principais vias ativadas pelo receptor tirosina-c-KIT e seus efeitos na carcinogênese.....	34
Figura 5	Principais vias ativadoras de MYC.....	37
Figura 6	Vias regulatórias de NDRG-1.....	42
Figura 7	Delineamento experimental do projeto.....	47
Figura 8	Equipamento automatizado de marcação imunoistoquímica <i>Ventana Benchmark</i>	53
Figura 9	Distribuição das pacientes portadoras de carcinomas vulva por faixas etárias.....	68
Figura 10	Curvas de sobrevida global em relação aos graus de escolaridade dentre as pacientes com carcinoma de vulva....	69
Figura 11	Distribuição dos sintomas mais comumente apresentados pelas pacientes com carcinomas de vulva	72

Figura 12	Curvas de sobrevida global em relação aos diferentes tipos histológicos dos tumores de vulva.....	76
Figura 13	Lâminas de H&E evidenciando os diferentes tipos histológicos de carcinomas de vulva.....	77
Figura 14	Curvas de sobrevida câncer específica e livre doença em relação à metástase linfonodal.....	78
Figura 15	Distribuição dos tumores do estudo em relação à localização.....	79
Figura 16	Distribuição dos tumores em relação ao estadiamento FIGO.....	80
Figura 17	Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação aos estadiamentos tumorais dentre as pacientes com carcinomas de vulva	80
Figura 18	Sobrevida global das pacientes em relação à recidiva do tumor.....	84
Figura 19	Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença das pacientes com carcinoma de vulva.....	85
Figura 20	Ilustração da técnica de imunistoquímica para a proteína HER-2 em carcinomas de vulva: marcação de membrana	87
Figura 21	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de doença para o marcador HER-2 no citoplasma.....	90
Figura 22	Imunistoquímica de EGFR em carcinomas de vulva: avaliação de marcação de membrana.....	92

Figura 23	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador EGFR.....	94
Figura 24	Imunoistoquímica para c-KIT em carcinomas de vulva: avaliação de imunorreatividade na membrana e/ou citoplasma.....	96
Figura 25	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador c-KIT.....	98
Figura 26	Imunoistoquímica para c-MYC em carcinomas de vulva.....	100
Figura 27	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador c-MYC com marcação citoplasmática.....	102
Figura 28	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador c-MYC com marcação citoplasmática e/ou nuclear.....	103
Figura 29	Imunoistoquímica para n-MYC considerando a marcação citoplasmática da proteína em carcinomas de vulva.....	105
Figura 30	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador n-MYC.....	107
Figura 31	Imunoistoquímica para NDRG1 em carcinomas de vulva.....	111
Figura 32	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador NDRG-1 no citoplasma/membrana.....	112
Figura 33	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador NDRG-1 com marcação nuclear.....	113
Figura 34	Hibridação in situ fluorescente (FISH) para HER-2 em carcinomas de vulva.....	115

Figura 35	Hibridação in situ fluorescente (FISH) para EGFR em carcinomas de vulva.....	117
Figura 36	Hibridação in situ fluorescente (FISH) para c-MYC em carcinomas de vulva.....	119
Figura 37	Hibridação in situ fluorescente (FISH) para n-MYC em carcinomas de vulva.....	121
Figura 38	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para a presença de HPV entre os tumores.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das Neoplasias Intraepiteliais Vulvares (VINs).	8
Tabela 2	Tipos Histológicos do Carcinoma Vulvar.....	12
Tabela 3	Estadiamento FIGO para o carcinoma de vulva.....	17
Tabela 4	Estadiamento TNM para o carcinoma de vulva.....	18
Tabela 5	Anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica.....	54
Tabela 6	Classificação da expressão de HER-2 (Guia de recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ Colégio Americano de Patologistas (ASCO/CAP).....	56
Tabela 7	Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma de vulva submetidas à ressecção cirúrgica segundo idade, raça, estado civil e escolaridade (São Paulo, 2011).....	68
Tabela 8	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos em relação ao grau de escolaridade das pacientes.....	69
Tabela 9	Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma de vulva quanto aos dados clínicos (São Paulo, 2011).....	71
Tabela 10	Distribuição das amostras em relação às características anatomo-patológicas dos tumores (São Paulo, 2011).....	75
Tabela 11	Sobrevidas Câncer Específica e Livre de doença em 5 anos em relação ao diagnóstico histopatológico dos tumores.....	76

Tabela 12	Sobrevida câncer específica e livre de Doença em 5 anos em relação à presença de metástases linfonodais.....	78
Tabela 13	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Recorrência em 5 anos em relação ao estadiamento FIGO.....	81
Tabela 14	Tipo de tratamento de escolha para as pacientes com carcinoma de de vulva (São Paulo, Brasil).....	82
Tabela 15	Desfecho clínico das pacientes com carcinoma de células escamosas da vulva (São Paulo, Brasil).....	83
Tabela 16	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos em relação à recidiva do tumor.....	84
Tabela 17	Imunoexpressão de membrana e citoplasma para HER-2 em carcinomas de vulva.....	86
Tabela 18	Imunoistoquímica para HER-2 em relação às características histopatológicas e dados clínicos das pacientes.....	89
Tabela 19	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador HER-2 no citoplasma.....	90
Tabela 20	Imunoexpressão de membrana e citoplasma para EGFR em carcinomas de vulva.....	91
Tabela 21	Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunoistoquímica para EGFR.....	93
Tabela 22	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador EGFR.....	94
Tabela 23	Imunoexpressão da proteína c-KIT em carcinomas de vulva..	96

Tabela 24	Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunistoquímica para c-KIT.....	97
Tabela 25	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em anos para o marcador c-KIT.....	98
Tabela 26	Imunoexpressão da proteína c-MYC em carcinomas de vulva.....	99
Tabela 27	Imunistoquímica para c-MYC em relação às características histopatológicas e dados clínicos das pacientes.....	101
Tabela 28	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador c-MYC no citoplasma.....	102
Tabela 29	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador c-MYC no citoplasma e na relação expressão citoplasmática/ nuclear.....	103
Tabela 30	Imunoexpressão da proteína n-MYC em carcinomas de vulva.....	104
Tabela 31	Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunistoquímica para n-MYC.....	106
Tabela 32	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador n-MYC.....	107
Tabela 33	Imunoexpressão da proteína NDRG-1 em carcinomas de vulva.....	108

Tabela 34	Imunoexpressão da proteína NDRG-1 no citoplasma vs núcleo.....	109
Tabela 35	Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunoistoquímica para o marcador NDRG-1.....	110
Tabela 36	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em anos para o marcador NDRG-1 no citoplasma.....	112
Tabela 37	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em anos para o marcador NDRG-1 nuclear.....	113
Tabela 38	FISH para os genes HER-2/CEP17 em carcinomas de vulva	114
Tabela 39	FISH para os genes EGFR/CEP7 em carcinomas de vulva...	116
Tabela 40	FISH para o gene c-MYC em carcinomas de vulva.....	118
Tabela 41	Comparação FISH vs Imunoistoquímica para o gene c-MYC	119
Tabela 42	FISH para o gene n-MYC em carcinomas de vulva.....	120
Tabela 43	Comparação FISH vs Imunoistoquímica para gene n-MYC...	121
Tabela 44	Genotipagem de HPVs em carcinomas de vulva e tipos infectantes.....	122
Tabela 45	Distinção entre quantidade de tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.....	123
Tabela 46	Distribuição dos dados epidemiológicos das pacientes em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.....	124

Tabela 47	Distribuição das variáveis anatomo-patológicas e clínicas em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.....	125
Tabela 48	Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para a presença de HPV entre os tumores.....	126
Tabela 49	Distribuição da expressão imunohistoquímica dos oncogenes avaliados em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	cinase PI-3 dependente da serina-treonina cinase
ATP	adenosina tri-fosfato
bHLHzip	Fatores de transcrição Hélice-Alça-Hélice Básicos e zíper de Leucina
CEC	carcinoma de células escamosas
CEV	carcinoma escamoso vulvar
CSF	fator de estimulação de colônia
c-KIT	oncogene homólogo do sarcoma viral felino V-kit Hardy-Zuckerman 4; CD117
DAB	diaminobenzidina
DAG	diacilglicerol
DAPI	4',6-diaminido-2-fenilindoleidrocloreto
DNA	ácido desoxirribonucléico
E5, E6, E7	proteínas precoces do HPV
ERBB	homólogo ao produto gênico viral v-erbB, eritroblastoma
EGF	fator de crescimento epitelial
EGFR	receptor do fator de crescimento epitelial
ERK	cinase regulada por sinal extracelular
FISH	hibridação <i>in situ</i> fluorescente
GRB₂	proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
HER	receptor epitelial humano
HIF1-α	fator induzido por hipóxia
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPV	vírus do papiloma humano
H&E	hematoxilina e eosina
IIQ	imunoistoquímica
IHQ	imunoistoquímica
IGH	imunoglobulina humana
IL2	interleucina 2

IP3	inositol trifosfato
kDa	kilodalton
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	proteína cinase ativada por mitógeno
mRNA	RNA mensageiro
MYC	oncogene homólogo ao v-myc myelocitomatose viral avícola
N	número de pacientes
NDRG1	Gene regulado <i>downstream</i> por n-MYC 1
NH₂	grupamento amino
NLS	sinal de localização nuclear
p	nível de significância
pRb	proteína do retinoblastoma
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGFR	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	fosfatidil inositol 3,4,5 cinase
PKC	proteína cinase C
PLCγ	fosfolipase C
PTEN	homóloga da fosfatase e tensina deletada no cromossomo 10
Rb	gene do retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
RR	risco relativo
SCC	carcinoma de células escamosas
SCF	fator de célula tronco
SCFR	receptor do fator de célula tronco
SD	desvio padrão
SOS	proteína <i>son of sevenless</i>
SSC	tampão citrato de sódio
STAT	transdutores de sinal e ativadores da transcrição
TAD	domínio de transativação
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TGFα	fator alfa de transformação do crescimento
TH1	Linfócitos <i>T helper</i>

TK	tirosina cinase
TKI	inibidor da tirosina cinase
TMA	microarranjo de tecidos
UV	ultravioleta
VIN	neoplasia intra-epitelial vulvar

LISTA DE SIGLAS

A.C.Camargo	Antônio Cândido Camargo
IARC	Agência Internacional de Pesquisas em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISGYP	Sociedade Internacional de Patologia Ginecológica
ISSVD	Sociedade Internacional para o Estudo de Doenças Vulvo-Vaginais
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
OMS	Organização Mundial da Saúde
NCI	National Cancer Institute
SAME	Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos
TNM	Tumor, Linfonodos e Metástases
UICC	União Internacional contra o câncer

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
<	menor que
>	maior que
=	igual a
cm	centímetros
g	força g/força centrífuga
mL	mililitros
mg	miligramas
µg	microgramas
°C	graus Celsius
rpm	rotações por minuto

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Anatomia e histologia da vulva	2
1.2	O carcinoma de vulva	3
1.3	Etiologia do Carcinoma de Vulva.....	4
1.4	Fatores de risco	5
1.4.1	Tabaco.....	6
1.4.2	VINs – Neoplasias Intraepiteliais Vulvares	7
1.4.3	HPV – Vírus do Papiloma Humano	8
1.4.4	Outros fatores de risco	10
1.5	Tipos Histológicos	11
1.6	Sinais e sintomas	14
1.7	Diagnóstico.....	15
1.8	Estádio da doença	16
1.9	Padrões de disseminação do carcinoma de vulva.....	16
1.10	Fatores prognósticos importantes	19
1.11	Tratamento	19
1.12	Considerações acerca do carcinoma de vulva	21
1.13	Oncogenes relacionados ao carcinoma de vulva	22
1.13.1	Família ERBB	24
1.13.2	c-KIT	32
1.13.3	Família MYC.....	34
1.13.4	NDRG1	39
1.14	Revisão da literatura.....	43
2	OBJETIVOS	45
2.1	Objetivo geral	45
2.2	Objetivos específicos.....	45
3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47

4	MÉTODOS	49
4.1	Pacientes e espécimes anatomo-patológicos.....	49
4.2	Critérios de inclusão e exclusão	
4.3	Coleta de dados clínicos.....	49
4.4	A construção dos tissue microarrays (TMAs)	50
4.5	A imunohistoquímica (IHC)	51
4.6	Avaliação imunohistoquímica	55
4.7	A hibridação in situ fluorescente (FISH)	58
4.8	Avaliação do FISH.....	59
4.9	Genotipagem de HPV	61
4.9.1	Isolamento de DNA genômico de tecidos.....	62
4.9.2	Amplificação por PCR.....	63
4.9.3	Reação de Hibridação	63
4.9.4	Fase de Detecção	63
4.10	A análise estatística.....	65
5	RESULTADOS	67
5.1	Caracterização da Amostra de Estudo	67
5.1.1	Dados Demográficos	67
5.1.2	Dados clínicos das pacientes	70
5.2	Caracterização Clínica e Anatomo-Patológica das amostras do Estudo	73
5.3	Avaliação de Oncogenes em Carcinomas de Vulva	85
5.3.1	Imunohistoquímica	85
5.4	FISH	114
5.4.1	HER-2.....	114
5.4.2	EGFR.....	116
5.4.3	c-MYC.....	118
5.4.4	n-MYC	120
5.5	Genotipagem de HPV	122

6	DISCUSSÃO	129
6.1	Aspectos epidemiológicos da casuística do estudo.....	129
6.2	Aspectos anatomo-patológicos e clínicos das pacientes do estudo.....	132
6.3	Avaliação dos oncogenes selecionados para o estudo	138
6.3.1	Família ERBB - HER-2 e EGFR	138
6.3.2	c-KIT	143
6.3.3	Família MYC.....	147
6.3.4	NDRG-1	153
6.4	HPV	156
7	CONCLUSÕES	161
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

ANEXOS

Anexo 1 Revisão Atualizada da Literatura dos Oncogenes selecionados no estudo e NDRG-1 em carcinomas de vulva

Anexo 2 Protocolo de Coleta de Dados Clínicos (SAME)

Anexo 3 Produção Científica Vinculada à Dissertação

A Artigos submetidos para Periódicos

B Trabalhos publicados em congressos

Anexo 4 Próximos passos

INTRODUÇÃO

"It is the theory that decides what we can observe".

Albert Einstein

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA VULVA

A vulva ou genitália externa feminina consiste no monte púbico, pequenos e grandes lábios, clitóris, além do orifício da uretra e pequenas glândulas localizadas no vestíbulo - espaço correspondente à abertura externa da vagina, incluído pelos pequenos lábios (FRISTACHI 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004), sendo abundantemente provida de vascularização e inervações (FONSECA-MOUTINHO 2008).

Os lábios menores são dobras da mucosa vaginal, contendo tecido conjuntivo penetrado por fibras elásticas e cobertos por epitélio pavimentoso estratificado com uma delgada camada de células ceratinizadas na superfície. As superfícies externas e internas, intermediárias entre pele e mucosa, apresentam glândulas sudoríparas e sebáceas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

Já os lábios maiores são dobras da pele com grande quantidade de tecido adiposo e uma fina camada de músculo liso, possuindo em sua superfície interna uma estrutura histológica semelhante à dos lábios menores e a superfície externa abundante em folículos pilosos. Em ambas as superfícies, glândulas sebáceas e sudoríparas são abundantes (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

O epitélio vulvar é conhecido por sofrer a ação de secreções vaginais, urina e fezes, sendo frequentemente traumatizado por produtos químicos de higiene e peças de vestuário (FONSECA-MOUTINHO 2008). Deste modo, grande número de doenças pode acometer a região da vulva, como as lesões dermatológicas, doenças sexualmente transmissíveis, repercussão de doenças locais e sistêmicas, urinárias ou cérvico-vaginais, lesões traumáticas, neoplasias benignas e malignas (MARTINS 1999; MONTAG e KUMAR 2008).

1.2 O CARCINOMA DE VULVA

O carcinoma escamoso de vulva é um tumor maligno que atinge a parte externa do aparelho reprodutor feminino e abrange cerca de 3 a 5% dos tumores desta região anatômica (FRISTACHI 2004; BUXANT et al. 2005; STROUP et al. 2008) sendo correspondente a menos de 1% das neoplasias malignas da mulher e com uma incidência mundial de aproximadamente 2,3/100.000 mulheres (National Cancer Institute-NCI 2011). De acordo com JONES et al. (1997) e LANNEAU et al. (2009), a incidência deste tipo de tumor tem aumentado consideravelmente, crescendo 2,4% por ano de 1992 a 1998.

No Brasil, estimativas atuais não mostram com clareza os dados acerca do câncer de vulva. Dados da Fundação Oncocentro apontaram, em 1990, uma incidência de 3,6/100.000 no Estado de São Paulo e, em 1992, a Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC), órgão da

Organização Mundial da Saúde (OMS), classificou a cidade de Recife com a maior incidência no mundo: 5,6/100.000 (FOSP 1990; PARKIN et al. 1992). A Sociedade Americana de Câncer estimou que, aproximadamente, 3900 novos casos de carcinoma de vulva seriam diagnosticados em 2010 nos Estados Unidos, resultando em 920 mortes (American Cancer Society-ACS 2011).

1.3 ETIOLOGIA DO CARCINOMA DE VULVA

Estudos baseados em dados epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e moleculares indicam a existência de duas categorias de carcinomas vulvares: uma relacionada ao papilomavírus humano (HPV) e a outra relacionada á mutações no gene Tp53 (PINTO 2002; VAN DER AVOORT et al. 2006; LANNEAU et al. 2009).

O primeiro grupo é composto por mulheres de faixa etária entre 35 e 65 anos de idade, nas quais os tumores, geralmente do tipo basalóide ou condilomatoso, estão frequentemente relacionados à infecção por HPVs de alto risco, como o HPV16, 18 e 33. VINs associadas a estes tumores são chamadas de VIN do tipo usual, de alto grau e existe um alto risco de aparecimento de tumores em outros sítios do trato genital inferior, principalmente na cérvix uterina (MONK et al. 1995; WOELBER et al. 2009).

Já na segunda categoria, as mulheres acometidas pela doença são de faixa etária mais avançada – de 55 a 85 anos de idade, aproximadamente

– e desenvolvem, tipicamente, um tipo ceratinizante de carcinoma de células escamosas invasivo, estando associado ao líquen escleroso, hiperplasia escamosa, neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) diferenciada e mutações em p53 (PINTO 2002; MONK et al. 1995; WOELBER et al. 2009).

O gene supressor de tumor Tp53 é vital na manutenção da integridade genômica e controle do ciclo celular. Conseqüentemente, perdas ou ganhos de sua função resultam em crescimento celular aberrante. (PIETSCH et al. 2008). Em carcinomas vulvares, mutações em Tp53 são consideradas como eventos oncogênicos iniciais na carcinogênese (MILDELANGOSCH et al. 1995; SCHEISTROEN et al. 1999). Mutações e/ou hiperexpressão de p53 correlacionam-se com taxas de sobrevivência global e livre de doença menores (SLIUTZ et al. 1997; KOHLBERGER et al. 1995) e pior prognóstico em pacientes com doença avançada (SCHEISTROEN et al. 1999).

1.4 FATORES DE RISCO

O carcinoma de vulva era, inicialmente, considerado uma doença que acometia apenas mulheres em idade mais avançada, entre 65 e 75 anos. Entretanto, o aumento da incidência tanto entre mulheres acima de 70 anos quanto em mulheres jovens tem sido observado nos últimos anos (FRISTACHI 2004; BUXANT et al. 2005; WANG et al. 2008). Este aumento está relacionado, principalmente, à infecção pelo HPV, ao consumo de tabaco (PARKIN et al. 1992; INSINGA et al. 2008), presença de neoplasias

intraepiteliais (VINs), dentre outros fatores que serão melhor abordados a seguir.

1.4.1 Tabaco

“O consumo de tabaco está entre os mais bem estabelecidos cofatores do HPV na etiologia das malignidades da cérvix uterina e da vulva” (HUSSAIN et al. 2008, p.1790).

Estudos têm demonstrado que mulheres fumantes possuem um risco aumentado de mais de três vezes para o carcinoma de vulva. Apesar do mecanismo biológico pelo qual o fumo aumenta o risco deste tipo de neoplasia ainda não estar bem estabelecido, HUSSAIN et al. (2008) demonstraram a presença de componentes do cigarro como a nicotina e a cotinina, bem como seus metabólitos no muco cervical de pacientes fumantes. Estes componentes têm sido associados com a diminuição das populações de células de Langerhans e linfócitos T, sendo estas responsáveis pela produção de Interleucina 2 (IL2) e pela propagação da resposta imune mediada por linfócitos T auxiliares (Th1), que é um mecanismo chave no combate à infecção pelo HPV. Sendo assim, um aumento da imunossupressão na paciente, gerado pela diminuição na concentração de IL2, parece atuar como um co-fator para a oncogênese vulvar por meio do HPV (MADRETSMA et al. 1996; LI et al. 1997; GEISELHART et al. 1997; MCCUE et al. 2000; HUSSAIN et al. 2008).

1.4.2 VINs – Neoplasias Intraepiteliais Vulvares

O termo Neoplasia Intraepitelial Vulvar (VIN) foi proposto há mais de 20 anos pela *Sociedade Internacional para o Estudo de Doenças vulvo-vaginais* (ISSVD) e, posteriormente, reconhecido pela *Sociedade Internacional de Patologia Ginecológica* (ISGYP) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2004, a entidade passou por alterações em sua terminologia: anteriormente classificadas como VINs I-III, elas são, agora, subdivididas em dois grupos: VIN clássica ou usual e VIN diferenciada ou simplex. De acordo com FONSECA-MOUTINHO (2008), a alteração da terminologia se deu pelo reconhecimento de que na vulva não existe zona de transformação como no colo do útero; pela baixa reprodutibilidade da VIN II; e de que as lesões VIN I, em geral, correspondiam a reações inflamatórias do epitélio vulvar desencadeadas por estímulos diversos.

Dentre as VINs clássicas, que compreendem as lesões de alto grau anteriormente denominadas VIN II e III, é possível detectar o genoma de HPVs de alto risco em 66 a 100% dos casos, especialmente dos HPVs 16, sendo que em cerca de 60% dos casos a doença é multifocal e/ou multicêntrica (FONSECA-MOUTINHO 2008; KNOPP et al. 2009).

O grupo das VINs diferenciadas representa as VINs de alto grau, que se apresentam, geralmente, como lesões unifocais e que se localizam na proximidade de carcinomas escamosos invasivos bem diferenciados (FONSECA-MOUTINHO 2008). Em sua maioria, não estão associadas ao

vírus do HPV, mas sim com líquen escleroso ou hiperplasia de células escamosas (KNOOPP et al. 2009).

Ao contrário da antiga classificação de VINs I-III, a segregação em VINs clássicas ou diferenciadas (**Tabela 1**) permitiu a clara visualização da existência das duas vias do desenvolvimento do carcinoma de vulva citadas anteriormente.

Tabela 1 - Classificação das Neoplasias Intraepiteliais Vulvares (VINs).

	VIN USUAL/ CLÁSSICA	VIN DIFERENCIADA/ SIMPLEX
Terminologia anterior	VIN graus II ou III	VIN III do tipo diferenciada
Associação	HPV	Líquen escleroso
Grupo etário	Mulheres abaixo de 45 anos	Mulheres acima dos 45 anos
Tipo de lesão	Condilomatosa e basalóide	Ceratinizante

1.4.3 HPV – Vírus do Papiloma Humano

O papilomavírus humano, HPV, é um vírus que possui como material genético o DNA dupla fita e que, ao infectar as células basais do epitélio por meio de micro-abrasões no tecido, desregula os *checkpoints* celulares. Esta desregulação ocorre através da interação entre os oncogenes virais com as proteínas regulatórias do ciclo celular, estando o ciclo de vida deste vírus intimamente associado ao programa de diferenciação da célula intraepitelial do hospedeiro (ZUR HAUSEN 2002).

Uma vez nas células da camada basal, a expressão gênica viral é reprimida. Apesar disto, existe neste momento uma expressão limitada de proteínas dos genes precoces virais (do inglês *early*), E5, E6 e E7, o que

resulta em um aumento da proliferação celular e expansão lateral das células infectadas. A proteína viral E5 parece ter importância nas fases iniciais do curso da infecção, através do estímulo do crescimento celular por meio da formação de complexos com EGFR, PDGFR, dentre outras proteínas do hospedeiro, além de prevenir o processo de apoptose seguido por dano ao DNA.

Após a entrada do vírus nas camadas parabasais, genes virais tardios (*late*) começam a ser expressos, o genoma circular do vírus é replicado e proteínas estruturais virais se formam. Já nas camadas superiores do epitélio, partículas virais são então montadas e liberadas para que ocorra a infecção de outras células (ZUR HAUSEN 2002).

Ainda de acordo com ZUR HAUSEN (2002), uma vez que o DNA viral episossomal se torna integrado ao DNA do hospedeiro, E5 é deletada e as proteínas E6 e E7 passam a ser expressas: E6 interage com p53 e E7 com RB, bloqueando, assim, a atividade supressora de tumor destes genes e de suas proteínas, imortalizando as células.

Estudos recentes têm demonstrado a prevalência de tipos específicos de HPV dentre os carcinomas do trato genital inferior. A maior parte concorda que o tipo 16 é o mais frequentemente encontrado, seguido dos tipos 33 e 18 (PINTO 2002). INSINGA et al. (2008) realizaram uma revisão sistemática a respeito da prevalência dos tipos de HPV dentre diversos tumores e lesões pré-tumorais de vagina, cérvix e vulva e demonstraram que, dentre os casos de carcinoma de células escamosas de vulva, o tipo mais freqüente foi o HPV 16, seguido dos tipos 33, 6, 18 e 31. Infecções por

mais de um tipo de vírus foram observadas em 5,8% dos casos e a proporção de casos positivos para qualquer tipo de HPV dentre os carcinomas de vulva foi de 65,3%.

1.4.4 Outros fatores de risco

Além dos fatores supracitados, o risco de desenvolvimento do carcinoma de vulva também parece estar relacionado a aspectos comportamentais, reprodutivos, hormonais e genéticos, dentre eles, a presença de outros carcinomas genitais, histórico de verrugas genitais, doenças inflamatórias crônicas vulvares, infecção pelo HIV, estados de imunossupressão (PINTO 2002; DAVIDSON et al. 2003) e idade avançada, relacionada à ocorrência de mutações no epitélio vulvar, decorrentes do processo de envelhecimento (PINTO 2002). Fatores que foram identificados para outros tumores epidermóides, como a exposição à luz solar e à radiação ultravioleta não parecem estar relacionados às lesões vulvares (BENEDET 2008).

Uma revisão retrospectiva de mulheres com carcinoma de vulva demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes com menos de 45 anos e HPV (Risco Relativo [RR], 11.34); fumo (RR, 2.83); mais de dois parceiros sexuais (RR, 2.87); início da vida sexual ativa antes dos 19 anos (RR, 2.43) e baixo status sócio-econômico (RR, 1.77). Já entre as pacientes com mais de 45 anos, a correlação foi estatisticamente significativa entre o risco relativo de carcinoma de vulva e VIN (RR, 23.6), residência em área rural (RR, 2.17), baixo status sócio-econômico (RR,

1.89), menopausa antes dos 45 anos (RR, 1.84), maus hábitos de higiene (RR, 1.76), distúrbios endócrinos (RR, 1.94) e baixos níveis de vitamina A no soro (RR, 1.78) (BASTA et al. 1999).

Em relação à dieta, PARAZZINI et al. (1995) demonstraram, através de um estudo caso-controle, um risco relativo aumentado para o carcinoma de vulva relacionado ao baixo consumo de vegetais verdes e cenoura pelas pacientes, indicando que este risco pode estar associado ao estado nutricional das mesmas. Este achado corrobora com o estudo anteriormente citado, que mostra o risco relativo inversamente proporcional aos níveis de vitamina A no soro (BASTA et al. 1999).

1.5 TIPOS HISTOLÓGICOS

O carcinoma de células escamosas (SCC ou CEC) ou epidermóide é o carcinoma de vulva mais comum, correspondendo a aproximadamente 90% dos tumores vulvares, sendo que este grupo é subdividido nas seguintes variantes morfológicas: carcinomas do tipo basalóide, condilomatoso, verrucoso, ceratinizante e não-ceratinizante (PINTO 2002; BUXANT et al. 2005). A outra porcentagem de tumores é composta por adenocarcinomas, melanomas, sarcomas, carcinomas verrucosos, basocelulares e doença de Paget (HOLSCHNEIDER e BEREK 2002), como demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Tipos Histológicos do Carcinoma Vulvar.

Tipo Histológico	Porcentagem
Carcinoma epidermóide	92
Melanoma	2-4
Carcinoma basocelular	2-3
Glândula de Bartholin (adenocarcinoma, células escamosas, células transicionais, adenóide cístico)	1
Sarcoma	<1

Fonte: HOLSCHNEIDER e BEREK (2002).

O carcinoma *in situ* é considerado uma lesão precursora do carcinoma invasivo, existindo um histórico de passado positivo de carcinoma *in situ* em pacientes com carcinomas vulvares (BENEDET 2008). Da mesma forma, cerca de 60% dos carcinomas de vulva possuem VIN adjacente, sendo que dentre os tumores superficialmente invasivos, esta coexistência chega a 85% (MOORE et al. 2009).

A seguir, serão abordadas as particularidades dos tipos histológicos de carcinomas de células escamosas de vulva com maior relevância na prática clínica.

O carcinoma escamoso ceratinizante bem diferenciado ou Carcinoma de Células Escamosas do tipo 1 (CEC1) apresenta notável maturação celular e ceratinização. As células da camada basal exibem atipia leve a moderada, sendo que esta diminui à medida que as células sofrem maturação. Este tipo de tumor é, frequentemente, associado à VINs diferenciadas e dermatoses inflamatórias, sendo geralmente negativas para o HPV (CRUM e GRANTER 2006).

Os carcinomas de células escamosas moderadamente diferenciados (CEC2) e pouco diferenciados (CEC3) são os mais comumente associados ao HPV, apresentando como principais características a presença de camadas de células escamosas neoplásicas imaturas com alta relação núcleo-citoplasma; uma tendência de crescimento coesivo e que imita a doença intraepitelial; perda de polaridade celular e a tendência de formação de camadas celulares irregulares; maturação variável, ceratinização e pseudocoilocitose. Estes tumores são, frequentemente, mas não invariavelmente, associados à VIN clássica e HPV (CRUM e GRANTER 2006).

Outra categoria é formada pelos carcinomas verrucosos, que são definidos como carcinomas epidermóides muito bem diferenciados, com baixo risco de formação de metástases linfonodais. O tumor é exófito e, além da falta de atipia, a invasão se faz em blocos celulares com contornos arredondados, de difícil avaliação. Uma característica deste tumor é a discreta interface epitélio-estroma, além de mínima atipia basal ou superficial (CRUM e GRANTER 2006; MOORE et al. 2009).

Além do tipo tumoral, a profundidade de invasão do tumor, espessura, padrão de crescimento, grau histológico, bem como a invasão do espaço vascular são características patológicas importantes. A profundidade de invasão é definida como a medida da junção dermoepidérmica até o ponto de invasão mais profundo do tumor. A espessura do tumor é a medida da superfície da lesão até o ponto de invasão mais profundo de invasão. Já o padrão de crescimento do tumor influencia nas taxas de metástases

linfonodais e sobrevivência. Três aspectos descrevem os padrões de crescimento tumoral: (1) padrão de crescimento confluyente, onde se observa uma massa tumoral de células interconectadas, sendo este tipo de crescimento característico dos tumores profundamente invasivos; (2) crescimento de padrão compacto, compressivo, no qual o tumor mantém continuidade com o epitélio adjacente e infiltra como uma massa tumoral bem definida e circunscrita. Geralmente são tumores bem diferenciados e raramente invadem o espaço vascular; (3) padrão de crescimento digitiforme (*finger-like*, *spray* ou difuso), padrão mais comum, e cujo crescimento é caracterizado por uma aparência trabecular com pequenas ilhas de células pouco diferenciadas na derme ou submucosa. A invasão do espaço vascular é mais comumente vista neste tipo de tumor que em outros de característica compacta (MOORE et al. 2009).

1.6 SINAIS E SINTOMAS

O carcinoma de vulva não possui sinais e sintomas característicos, sendo cerca de 10% das doentes assintomáticas (FONSECA-MOUTINHO 2008). No entanto, os sintomas mais comumente relatados são o prurido vulvar, ardor, dispareunia, sangramento, corrimento, nódulo ou ulceração e áreas da pele com cor e textura alteradas (FONSECA-MOUTINHO 2008; LANNEAU et al. 2009).

O carcinoma vulvar pode ter uma variedade de apresentações clínicas com base na duração, local e no tipo histológico. As lesões podem ser

ulcerativas, nodulares ou exofíticas e geralmente estão localizadas nos lábios e nas estruturas laterais da metade superior da vulva. As lesões que surgem no clitóris ou períneo são menos comuns, mas são locais primários nos quais as lesões são facilmente reconhecíveis (BENEDET 2008).

1.7 DIAGNÓSTICO

Para a avaliação da paciente com carcinoma de vulva devem ser levados em consideração a extensão clínica do tumor, a presença de doenças coexistentes e planos de tratamento prévios. A avaliação inicial deve incluir um exame físico detalhado da paciente constando as medidas do tumor primário, avaliação da extensão da mucosa adjacente e estruturas ósseas, além do possível envolvimento de linfonodos inguinais (MOORE et al. 2009).

Estudos radiográficos e endoscópicos devem ser considerados nas pacientes com tumores primários de grande tamanho ou com suspeita de metástase. Além disso, pelo fato das neoplasias do trato genital feminino serem comumente multifocais, a avaliação da vagina e da cérvix, incluindo exames de citologia oncológica, deve ser sempre realizada em mulheres com carcinoma vulvar (MOORE et al. 2009).

A recomendação geral na prática médica é de que todos os casos suspeitos de carcinoma vulvar sejam submetidos à biópsia para confirmar o diagnóstico e a caracterização histológica dessas lesões antes de qualquer terapia definitiva (BENEDET 2008).

1.8 ESTÁDIO DA DOENÇA

A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) adotou em 1989 um sistema de estágio cirúrgico modificado para o carcinoma de vulva, o qual permaneceu quase sem alterações nas novas recomendações em 1995 (MOORE et al. 2009), como mostrado na **Tabela 3**.

O sistema anterior fornecia informações confiáveis a respeito do tamanho e na localização do tumor primário, mas apresentava uma avaliação ineficaz do acometimento linfonodal em cerca de 20 a 30% dos casos. A frequente discrepância entre o estadiamento clínico e os achados cirúrgico-patológicos levaram à aceitação da avaliação cirúrgica do *status* linfonodal utilizada hoje. A American Joint Committee on Cancer publicou um esquema de classificação TNM (**Tabela 4**) que é correlacionado com o sistema FIGO e é utilizado atualmente (MOORE et al. 2009).

1.9 PADRÕES DE DISSEMINAÇÃO DO CARCINOMA DE VULVA

Os carcinomas de vulva costumam metastatizar de três maneiras distintas: (1) disseminação por crescimento local e extensão pelos tecidos adjacentes; (2) disseminação por meio da embolização linfática para linfonodos regionais; (3) disseminação por via hematogênica para sítios distantes. A descrição clínica objetiva do crescimento local do tumor,

categorizada no TNM, é de grande valia para o estabelecimento de uma margem ampla na ressecção cirúrgica (MOORE et al. 2009).

Tabela 3 - Estadiamento FIGO para o carcinoma de vulva (2009).

Estádio	Achados clínicos
Estadio 0	Carcinoma in situ; carcinoma intraepitelial
Estadio IA	Tumor confinado à vulva ou períneo; 2 cm ou menos na maior dimensão; com invasão estromal menor ou igual a 1mm e sem metástase linfonodal
Estadio IB	Tumor confinado à vulva ou períneo; 2 cm ou menos na maior dimensão; com invasão estromal maior que 1mm e sem metástase linfonodal
Estadio II	Tumor de qualquer tamanho com disseminação adjacente (1/3 uretra inferior, 1/3 vagina, ânus); sem metástase linfonodal
Estadio IIIA	Tumor de qualquer tamanho com metástase linfonodal inguino-femoral
	(i) 1 linfonodo acometido maior ou igual a 5 mm
	(ii) 1-2 linfonodo(s) acometido(s) em menos de 5mm
Estadio IIIB	
	(i) 2 ou mais metástases linfonodais maiores ou iguais a 5mm
	(ii) 3 ou mais metástases linfonodais menores que 5mm
Estadio IIIC	Linfonodos positivos com disseminação extra-capsular
Estadio IVA	
	(i) Tumor invade outras estruturas regionais (2/3 uretra superior, 2/3 vagina), mucosa da bexiga, mucosa retal ou fixação ao osso pélvico
	(ii) Linfonodos inguino-femorais fixos ou ulcerados
Estadio IVB	Metástase à distância, incluindo linfonodos pélvicos

Fonte: TAN et al. (2010)

Tabela 4 - Estadiamento TNM para o carcinoma de vulva .

Tumor Primário (T)			
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado		
T0	Sem evidência de tumor primário		
Tis	Carcinoma in situ; carcinoma pré-invasivo		
T1	Tumor confinado à vulva ou à vulva e períneo, com 2cm ou menos na maior dimensão		
T2	Tumor confinado à vulva ou à vulva e períneo, maior que 2cm na maior dimensão		
T3	Tumor invade uma das seguintes estruturas: uretra inferior, vagina ou ânus		
T4	Tumor invade uma das seguintes estruturas: mucosa da bexiga, mucosa da uretra superior ou mucosa retal ou tumor fixado ao osso		
Linfonodos regionais (N)			
Nx	Linfonodos regionais não puderam ser avaliados		
N0	Sem metástase linfonodal regional		
N1	Metástase linfonodal regional unilateral		
N2	Metástase linfonodal regional bilateral		
Metástase à distância (M)			
Mx	Presença de metástases à distância não pode ser avaliada		
M0	Sem metástase à distância		
M1	Metástases à distância (metástase em linfonodos pélvicos é M1)		
Grupamento por Estágios			
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
Estágio IVA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4	Qualquer N	M0
Estágio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: MOORE et al. (2009)

1.10 FATORES PROGNÓSTICOS IMPORTANTES

O padrão de disseminação do carcinoma vulvar é, predominantemente, linfogênico, sendo o estado dos linfonodos o fator prognóstico isolado mais importante para este tipo de tumor (HACKER 2005). As pacientes com apenas um linfonodo microscopicamente envolvido têm prognóstico comparável àquelas com linfonodos negativos (HOLSCHNEIDER e BEREK 2002), enquanto a taxa de sobrevida em dois anos é de 20% nas pacientes com três ou mais linfonodos metastáticos. A taxa de sobrevida de pacientes com linfonodos pélvicos positivos é de aproximadamente 11%. Linfonodos que parecem fixos nas estruturas mais profundas da região inguinal ou na pele, geralmente significam doença em estágio avançado com um prognóstico ruim (BENEDET 2008).

Além da demonstração consistente de que o envolvimento dos linfonodos regionais é o fator de prognóstico mais importante do carcinoma vulvar, diversos estudos também demonstraram que o tamanho do tumor primário é um indicador significativo para a sobrevida, a recidiva local e também para a própria metástase linfática (BENEDET 2008).

1.11 TRATAMENTO

O tratamento das lesões é necessário para o alívio sintomático da doente, bem como para evitar progressão da doença. Na década de 50, a vulvectomy radical era o tratamento preferencial (FONSECA-MOUTINHO

2008), sendo que o desenvolvimento deste tipo de cirurgia, juntamente com a linfadenectomia inguinfemoral bilateral, trouxeram uma grande melhoria na sobrevida das pacientes, quando comparadas às opções cirúrgicas que eram antes disponíveis. No entanto, a cirurgia radical está associada à complicações pós-operatórias, tais como, deiscência da ferida, infecção e linfedema, além de trazer significativa morbidade e conseqüências psicossociais importantes, especialmente para as mulheres mais jovens (PODRATZ et al. 1983; ANDERSEN e HACKER 1983; MOORE et al. 2009).

Atualmente, a terapia é escolhida de acordo com a extensão da doença, histórico médico, estado geral da mulher, recorrência ou primariedade do tumor, bem como a opinião da paciente, optando-se desde a terapia com laser até as cirurgias, radio e quimioterapia. Muitos ginecologistas acreditam que tumores vulvares menores podem ser conduzidos de formas aceitáveis com abordagens cirúrgicas menos radicais e propõem ressecções mais limitadas para doença precoce ou de baixo risco. Como vantagens para este tipo de abordagem tem-se a manutenção de porções significantes de vulva não acometida pelo tumor, morbidade operatória diminuída, bem como menores complicações pós-operatórias (MOORE et al. 2009).

1.12 CONSIDERAÇÕES ACERCA DO CARCINOMA DE VULVA

O interesse médico pelo carcinoma de vulva se acentuou na última década, dado o reconhecimento da crescente incidência da doença, especialmente em mulheres jovens. No entanto, pelo fato do carcinoma de vulva ser uma doença neoplásica incomum, sua relativa raridade é um dos maiores obstáculos em se desenhar estudos prospectivos randomizados. As tendências atuais no manejo desta doença são focadas em uma abordagem mais individualizada que enfatiza a ressecção cirúrgica conservadora da vulva, quando possível, o uso de procedimentos reconstrutivos para preservar ou restaurar a função do órgão, a potencial redução de complicações através de biópsias de linfonodos sentinela, além de terapias multimodais para a doença disseminada e avançada. Entretanto, a maioria dos dados que suportam estes conceitos são preliminares e maiores investigações são necessárias para o aperfeiçoamento contínuo dos critérios usados para selecionar as pacientes para procedimentos cirúrgicos específicos (MOORE et al. 2009).

Deste modo, a identificação das alterações em oncogenes em carcinomas vulvares pode ajudar a elucidar os mecanismos biológicos do desenvolvimento deste tipo de câncer, além de, potencialmente, buscar novos conceitos de tratamento que é, ainda, mutilante e altera a qualidade de vida e fatores psicossociais da mulher.

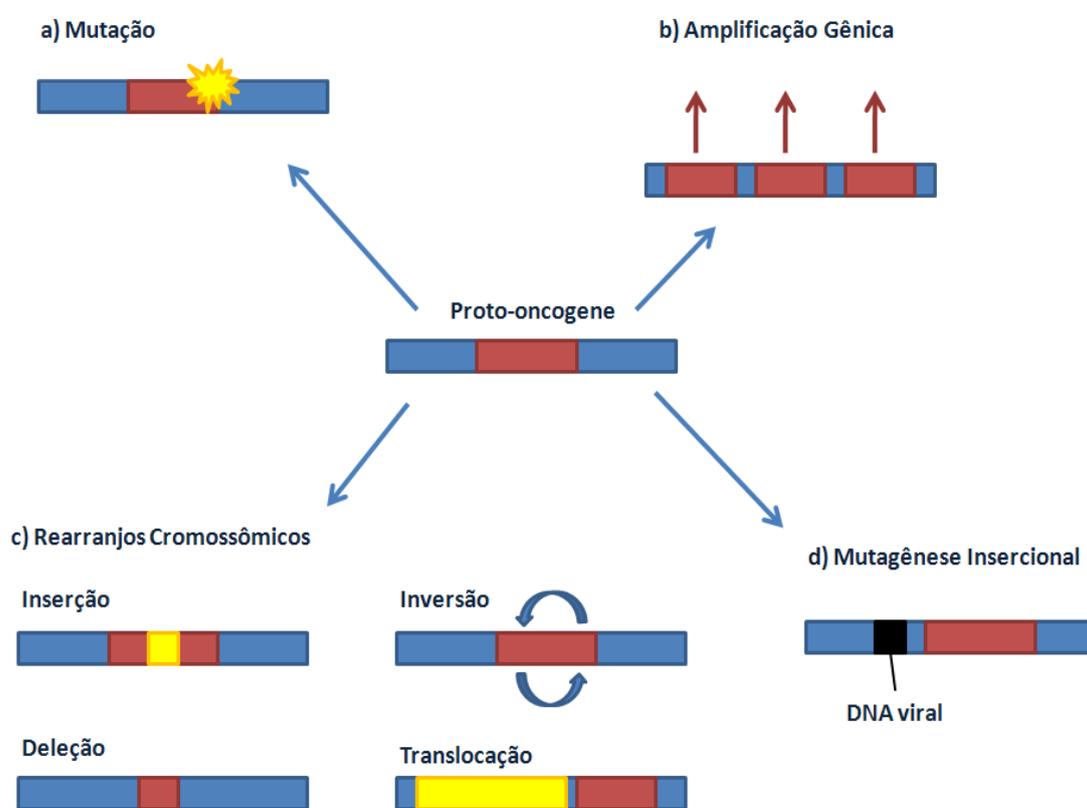
1.13 ONCOGENES RELACIONADOS AO CARCINOMA DE VULVA

Alterações oncogênicas atuam em uma célula tumoral como mutações dominantes de ganho de função, sugerindo que as proteínas codificadas por oncogenes são ativadas nestas células e que a mutação precisa estar presente em apenas um alelo para contribuir para a formação do tumor. O gene em sua forma normal, não-mutada, é chamado proto-oncogene e o produto protéico expresso continuamente por um oncogene é denominado oncoproteína (GRIFFITHS et al. 2009).

Várias categorias de oncogenes foram identificadas de acordo com os modos diferentes nos quais as funções regulatórias foram desacopladas da via reguladora normal, levando à sua expressão desregulada contínua, e esta hiperexpressão tem importante fator prognóstico (GRIFFITHS et al. 2009).

Oncogenes podem ser ativados por vários mecanismos, como os ilustrados na **Figura 1**: (a) **Mutação**: Mutações ativam proto-oncogenes através de alterações estruturais na proteína traduzida, gerando uma atividade contínua e descontrolada da proteína mutada. Vários tipos de mutações como as substituições, deleções e inserções de bases são capazes de ativar os proto-oncogenes; (b) **Amplificação gênica**: Em tumores sólidos, é o mecanismo mais comum de ativação de oncogenes e conta com a expansão do número de cópias de um gene, resultando em uma hiperexpressão da proteína correspondente; (c) **Rearranjos Cromossômicos**: Consistem em traslocações, inversões cromossômicas, inserções e

deleções gerando proteínas oncogênicas quiméricas; (d) Mutagênese insercional: a inserção de partes de DNA viral, por exemplo, em um proto-oncogene ou próximo a ele, altera a sequência codificadora ou elementos regulatórios, podendo causar uma hiperexpressão de proteínas oncogênicas, levando a um evento tumorigênico (ROTMENSCH e HERBST 1997; MOORE et al. 2009).



Legenda: Representação esquemática dos mecanismos de ativação de um proto-oncogene (centro): a) Mutação, representada em amarelo; b) Amplificação gênica, em que a expansão do número de cópias do gene está indicada em vermelho; c) Rearranjos cromossômicos: Inserção indicada em amarelo; inversão indicada com setas inversas; deleção indicando a ausência de parte do gene em vermelho e translocação indicada em amarelo (gene translocado); d) Mutagênese insercional: Inserção de DNA viral indicada em preto.

Figura 1 - Representação esquemática dos principais mecanismos de ativação oncogênica

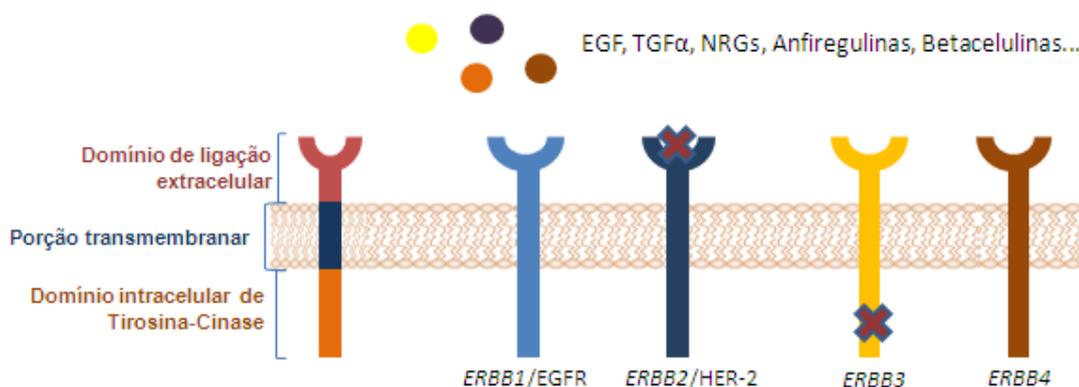
1.13.1 Família ERBB

“A via dos receptores ERBB é uma das áreas mais estudadas no que se refere à transdução de sinal, e a que melhor exemplifica o poder patogênico das aberrações na transferência de informações biológicas” (CITRI e YARDEN 2006, p.505).

A subclasse I da superfamília dos receptores de tirosina-cinase consiste em 4 receptores intimamente relacionados: EGFR/ERBB1, HER-2/ERBB2, ERBB3/HER-3 e ERBB4/HER-4 (HYNES e LANE 2005). O nome ERBB é derivado da homologia das proteínas da família com o produto gênico do eritroblastoma viral, v-erbB, responsável pela eritroblastose aviária (CITRI e YARDEN 2006; MOORE et al. 2009). Estes receptores são expressos em vários tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neuronal. Sob condições fisiológicas normais, a ativação dos receptores ERBB é controlada pela expressão espacial e temporal de seus ligantes (HYNES e LANE 2005; CITRI e YARDEN 2006).

Apesar de a família ERBB ser considerada o grupo prototípico da família de receptores de tirosina-cinase, com um domínio de ligação extracelular amino (NH₂), uma região transmembranar e um domínio intracelular de tirosina-cinase (TK) (SCALTRITI et al. 2010), é importante ressaltar que dois membros da família, ERBB2/HER-2 e ERBB3 são considerados membros “não-autônomos”. Esta definição se deve ao fato de que HER-2 não possui capacidade de interação com ligantes do grupo dos fatores de crescimento e ERBB3 possui atividade tirosina-cinase intrínseca defectiva (**Figura 2**). No entanto, apesar da falta de autonomia, ambos os

receptores são capazes de gerar sinalização intracelular devido à formação de heterodímeros com os outros membros da família. Ainda, HER-2 é o membro preferido para heterodimerização com os outros componentes da família, além de sofrer endocitose lenta, sendo frequentemente reciclado de volta para a superfície da membrana celular (CITRI e YARDEN 2006).



Legenda: Representação esquemática dos membros da família ERBB estando ilustrados à esquerda a porção extracelular (vermelho), transmembranar (azul) e intracelular (domínio de tirosina-cinase – laranja) dos receptores; à direita, os quatro membros da família, sendo dois deles autônomos (ERBB1 em azul claro e ERBB4 em laranja) e dois não-autônomos (ERBB2, em azul escuro, defeitivo na capacidade de interação com os ligantes e ERBB3, defeitivo na atividade tirosina-cinase, ambos representados com um X). Os ligantes estão ilustrados com símbolos de círculos coloridos (acima).

Figura 2 - Receptores da família ERBB, suas particularidades e ligantes

De modo geral, o acoplamento de um ligante a um receptor ERBB induz a formação de homo e heterodímeros e a ativação do domínio de cinase intrínseca, resultando na fosforilação de resíduos de tirosina específicos na porção citoplasmática. Uma vez fosforilados, estes resíduos atuam como sítios de ligação para uma gama de proteínas, cujo

recrutamento leva à ativação de vias de sinalização intracelulares, que serão abordadas a seguir (HYNES e LANE 2005).

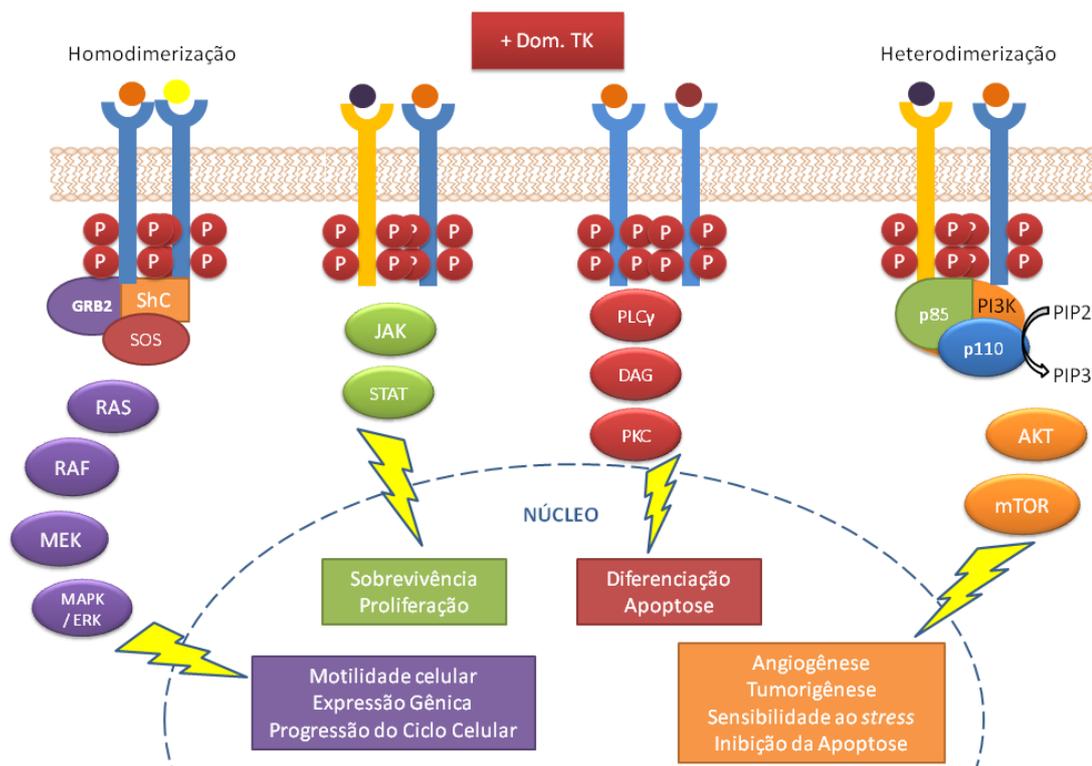
As principais vias ativadas pelos receptores da família ERBB são as vias de MAPK, PI3K-AKT, STATs e PLC γ que estão ilustradas na **Figura 3**. A via de Ras-MAPK (Proteína Cinase Ativada por Mitógeno) pode ser ativada tanto através do recrutamento direto de GRB₂ (Proteína 2 Ligada ao Receptor do Fator de Crescimento) ao domínio SH₂ quanto através do recrutamento indireto de GRB₂ pelo adaptador SHC. RAS é, então, ativada por fosforilação mediada por SOS (Proteína *Son of Sevenless*). Uma vez ativada, RAS se liga a RAF que, por sua vez, desencadeia a fosforilação de MEK_{1/2} (proteína cinase ativada por mitógeno 1/2) e ERK_{1/2} (Cinase regulada por sinal extracelular 1/2). Esta última, uma vez fosforilada, é translocada para o núcleo e é responsável por ativar vários fatores de transcrição (MOORE et al. 2009).

Os receptores ERBB podem ativar, também, PI3K (Fosfatidilinositol 3 cinase), que fosforila PI4,5-bifosfato em PI3,4,5-trifosfato, gerando a ativação de AKT, que uma vez fosforilada, desempenha várias funções no citoplasma e no núcleo, incluindo a inibição de fatores pró-apoptóticos, além da ativação de mTOR (Alvo da Rapamicina em Mamíferos) sendo esta ativação de suma importância no estímulo da proliferação celular e angiogênese (MOORE et al. 2009).

A fosforilação dos receptores ERBB pode, direta ou indiretamente, ativar Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição (STATs) que, uma vez fosforilados, são translocados para o núcleo e regulam de forma direta a

expressão gênica responsável pela sobrevivência celular, proliferação, transformação e oncogênese (MOORE et al. 2009).

Por fim, outra via ativada pelos receptores tirosina-cinase da família ERBB é a via de PLC γ (Fosfolipase C- γ), proteína que se liga aos domínios de tirosina-cinase fosforilados através de SH₂ e torna-se ativa. Neste estado, ela hidrolisa PI4,5-bifosfato em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) e este último medeia a liberação de cálcio dos compartimentos intracelulares, afetando enzimas cálcio-dependentes. Já o DAG atua como um cofator para a ativação de PKC (Proteína Cinase C), que no estado ativo resulta na progressão do ciclo celular, transformação, diferenciação e apoptose (MOORE et al. 2009).



Legenda: Estão ilustradas na figura as principais vias ativadas pela homodimerização ou heterodimerização dos receptores membros da família ERBB e a conseqüente fosforilação dos domínios de tirosina-cinase (representados com círculos vermelhos junto às porções intracelulares dos receptores), que desencadeia no recrutamento e acoplamento de várias proteínas intracelulares que, por sua vez, ativam as 4 vias indicadas em cores (Via da MAPK em roxo, STATs em verde, PLC γ em vermelho e PI3K em laranja) e culminam com as atividades celulares destacadas em retângulos.

Figura 3 - Principais vias ativadas pelos receptores da família ERBB e seus efeitos na carcinogênese.

Receptores da família ERBB atuam normalmente durante o desenvolvimento, fisiologia no adulto, mas também no desenvolvimento de vários tipos de tumores (HYNES e LANE 2005; KNOPP et al. 2009), incluindo o carcinoma de vulva, no qual EGFR e HER-2 já foram descritos.

EGFR, Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico, foi o primeiro receptor tirosina-cinase a ser diretamente relacionado a tumores humanos (HYNES e LANE 2005) e encontra-se hiperexpresso em 41 a 68% dos carcinomas de vulva em análises imunoistoquímicas (JOHNSON et al. 1997; WU et al. 2001; BRUSTMANN 2007; OONK et al. 2007).

Com relação à sobrevida das pacientes, uma hiperexpressão imunoistoquímica de EGFR em mais de 90% das células tumorais está associada com uma taxa de sobrevida livre de doença de 25%, enquanto pacientes com expressão em menos de 90% das células apresentaram uma taxa de 54% (JOHNSON et al. 1997). Além disso, a amplificação do gene EGFR, localizado em 7p11.2, em carcinomas de vulva foi correlacionada com uma diminuição da sobrevida (WU et al. 2001).

O aumento da expressão de EGFR também foi observado à medida que o epitélio normal torna-se malignizado. No entanto, nenhuma relação entre esta expressão e o estágio da doença, grau do tumor, recorrência ou índice de proliferação foi observado (BRUSTMANN 2007).

Embora a presença de metástases linfonodais tenha sido associada com a expressão de EGFR, de acordo com OONK et al. (2007), os fatores preditivos clínico-patológicos para metástase linfonodal inguinfemoral atuais, com ou sem análise acerca da expressão de EGFR não são

suficientemente robustos para a identificação dos pacientes que estão sob risco de metástases. Deste modo, tornam-se necessárias novas abordagens para examinar estas questões, uma vez que a maioria dos estudos disponíveis não mostra a indicação do número absoluto de pessoas que podem ser beneficiadas com a adição desses parâmetros biológicos nos diagnósticos de rotina.

Apesar da falta de correlação entre a expressão de EGFR e fatores prognósticos, o conhecimento de suas propriedades biológicas, moleculares e estruturais tem sido essencial para o desenvolvimento de inibidores de tirosina-cinase, tais como o Cetuximab, Gefitinib (“Iressa”) e Erlotinib (“Tarceva”) e relatos de caso têm demonstrado a eficácia destas drogas no carcinoma de vulva. Erlotinib, por exemplo, produziu respostas importantes em pacientes mais velhas com doença localmente avançada (RICHARD et al. 2008). Além disso, a associação de radioterapia com cetuximab e cisplatina mostrou a indução de resposta parcial por 5 meses em uma paciente com carcinoma recorrente e metastático (OLAWAIYE et al. 2007).

Em relação ao HER-2, alguns estudos demonstraram hiperexpressão deste receptor em 47% dos carcinomas de vulva avaliados por imunohistoquímica (GORDINIER et al. 1997), sendo que esta parece estar associada com metástases a distância. Outros estudos sugerem que esta hiperexpressão de HER-2 em carcinomas de células escamosas do trato genital inferior é um evento raro, mas que pode ser associada a um comportamento biológico mais agressivo do tumor (BERCHUCK et al. 1990). A hiperexpressão de HER-2 em neoplasias malignas primárias da vulva

também tem sido relacionada a tumores de alto grau e um alto número de figuras de mitose (HANTSCHMANN et al. 2005; KNOPP et al. 2009).

Uma observação interessante feita por HANTSCHMANN et al. (2005) é a presença frequente de marcação citoplasmática de HER-2 nos tumores da vulva. Este padrão também foi observado em outros tipos de câncer, tais como de endométrio (LAMBROPOULOU et al. 2007), colorretal (OSAKO et al. 1998), mama (SCALTRITI et al. 2010) e tireóide (SUGG et al. 1998). Em osteosarcomas, por exemplo, a expressão citoplasmática de HER-2 parece estar relacionada ao aumento de risco para metástases pulmonares e está associada com menor sobrevida livre de metástases (ZHOU et al. 2003). No entanto, não existem dados a respeito da função do HER-2 citoplasmático em tumores da vulva, sendo necessários maiores estudos das implicações e aplicações clínicas que esta expressão pode acarretar.

Em relação à terapia, FUKUTOME et al. (2006) demonstraram em uma linhagem celular de vulva (A431) que a combinação simultânea da inibição de HER-2 e EGFR com Trastuzumab (“Herceptin”) e ZD1839 (“Iressa”), respectivamente, mostraram um efeito radiosensibilizador sinérgico. Desta forma, um duplo direcionamento à família ERBB pode ser de grande eficácia contra tumores nos quais ambas as vias estão ativas.

Além das drogas relatadas acima, vários anticorpos contra o domínio extracelular destes receptores, bem como inibidores de tirosina-cinase (TKIs) estão em estágio avançado de desenvolvimento e teste, e uma vez que os receptores da família ERBB estão ativados de forma aberrante em

uma gama de tumores humanos, eles se tornam excelentes candidatos para as terapias seletivas anti-câncer (HYNES e LANE 2005).

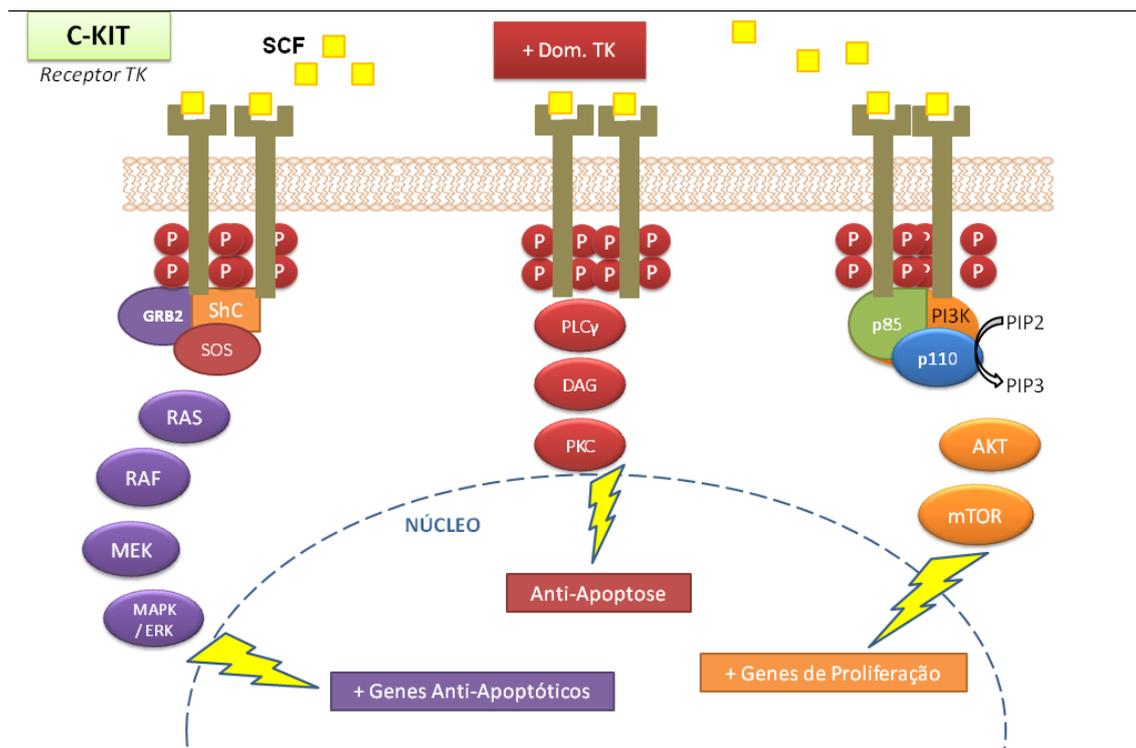
1.13.2 c-KIT

O proto-oncogene c-KIT, também conhecido como CD117 ou SCFR, é o homólogo humano do oncogene de sarcoma viral v-kit Hardy-Zuckerman 4. Situado no braço longo do cromossomo 4 na posição 4q11.12, este gene é fisiologicamente expresso em melanócitos, células germinativas (MAEDA et al. 1992; KRAMS et al. 2004), mastócitos teciduais, epitélio mamário e glandular sudoríparo, e nas células da camada basal da pele (TSUURA et al. 1994; KRAMS et al. 2004; MAFFINI et al. 2008). Durante o desenvolvimento e na fase adulta, c-KIT modula vários processos incluindo sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação das células hematopoiéticas, germinativas e células derivadas da crista neural (LEV et al. 1994; SPERLING et al. 1997).

c-KIT é membro da família III dos receptores tirosina-cinase (Família β -PDGFR/CSF-1), codifica um receptor transmembranar e possui um ligante específico chamado SCF (Fator de Célula Tronco, conhecido também como Ligante c-KIT ou Fator de Crescimento de Mastócitos). SCF possui duas formas de *splicing* alternativo: enquanto a forma solúvel estimula, imediatamente, a atividade tirosina-cinase, a forma ligada à membrana produz efeitos em longo prazo, aumentando a estabilidade do receptor e prevenindo sua rápida hiporegulação (KRAMS et al. 2004).

A interação entre SCF e o receptor c-KIT ativa a função tirosina-cinase que, por sua vez, induz a fosforilação de várias proteínas celulares e a ativação de uma série de cascatas, dentre elas a via de RAS, PI3K e PLC γ (**Figura 4**), que já foram abordadas anteriormente.

A frequência de acúmulos de mutações no gene c-Kit é grande e, dessa forma, ocorre um aumento progressivo da ação da fosforilação, com conseqüente expansão na proliferação celular e resistência à apoptose. Em decorrência disto, este gene tem sido proposto como tendo papel importante na carcinogênese (SPERLING et al. 1997), e o sistema SCF/c-KIT tem sido implicado na carcinogênese do trato genital feminino. Estas circunstâncias nos levam a investigar o papel deste oncogene no carcinoma da vulva, uma vez que a literatura é escassa neste aspecto.



Legenda: A dimerização de receptores c-KIT a partir do acoplamento do SCF (amarelo) leva à fosforilação dos domínios de tirosina-cinase (representados com círculos vermelhos junto às porções intracelulares dos receptores), o que desencadeia no recrutamento e acoplamento de várias proteínas intracelulares que, por sua vez, ativam as 3 vias indicadas em cores (Via da MAPK em roxo, PLC γ em vermelho e PI3K em laranja) e culminam com as atividades celulares destacadas em retângulos.

Figura 4 - Principais vias ativadas pelo receptor tirosina-cinase c-KIT e seus efeitos na carcinogênese

1.13.3 Família MYC

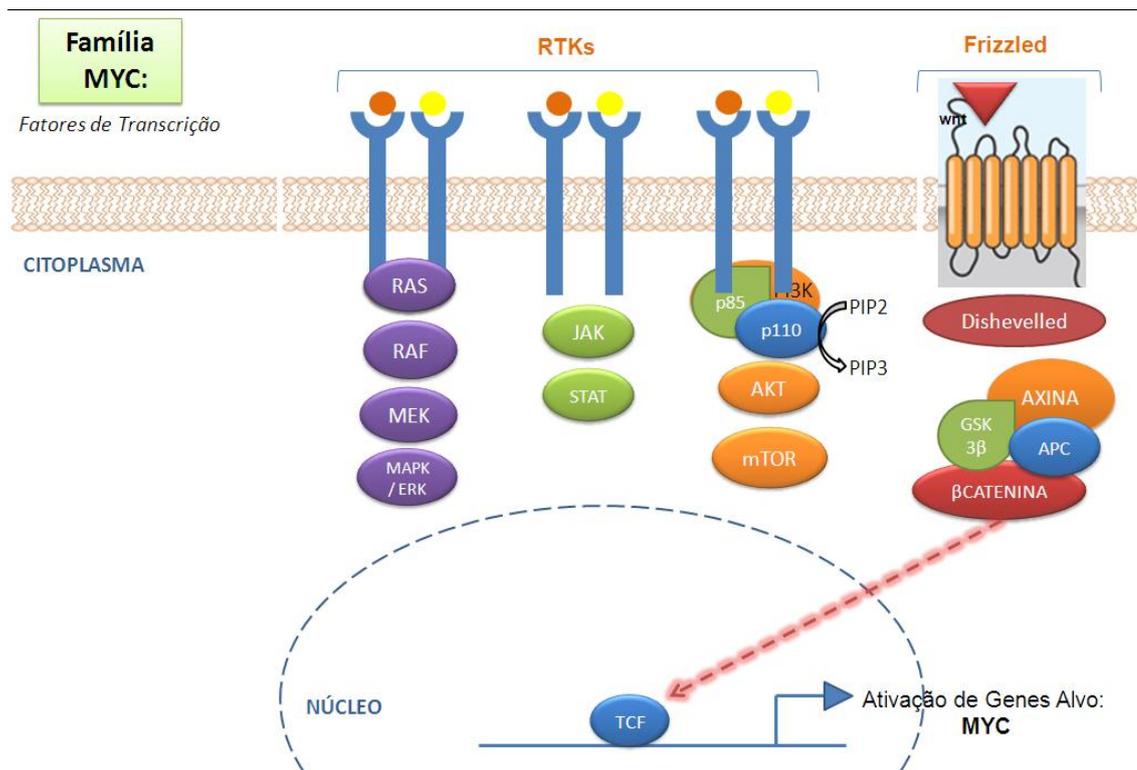
“A expressão desregulada de MYC possui um *status* quase onipresente nos tumores – daí o seu apelido: McGene. Para onde você olha, lá está ele. Sendo assim, entender como MYC impulsiona e mantém o crescimento tumoral é fundamental” (DANOVI 2010, p.532).

O estudo do papel dos oncogenes da família MYC teve início com SHEINESS e BISHOP (1979) que, investigando um subgrupo de retrovírus

causadores de mielocitomatose aviária, identificaram o gene v-MYC (Mielocitomatose Aviária Viral). Mais tarde, o gene C-MYC foi identificado como o homólogo celular do oncogene retroviral, e foi demonstrado por encontrar-se expresso em uma ampla gama de tumores e tecidos. Logo depois, dois outros genes relacionados foram encontrados amplificados em tumores humanos: N-MYC, que parece estar associado a tecidos embrionários e tumores neuroendócrinos e L-MYC, expresso em tumores de pulmão (DANG 1999; BOON et al. 2001; FARIA e RABENHORST 2006). c-MYC e n-MYC são essenciais ao desenvolvimento dos vertebrados (NILSSON e CLEVELAND 2003) e sua superexpressão parece possuir papel importante no desenvolvimento de vários tumores (DANG 1999; BOON et al. 2001; FARIA e RABENHORST 2006).

Como supracitado, a expressão de MYC é indispensável durante o desenvolvimento embrionário normal e é regulada por sinais externos como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, e sinais internos como a maquinaria de ativação do ciclo celular (FARIA e RABENHORST 2006). Já a ativação dos oncogenes MYC pode ocorrer através de mecanismos tais como rearranjos, ampliações e translocações do gene, como observado no Linfoma de Burkitt, em que ocorre a justaposição da região promotora do gene da cadeia pesada de imunoglobulina ao lado do sítio gênico de c-MYC. Além disso, o aumento da tradução ou da estabilidade de suas proteínas (NILSSON e CLEVELAND 2003) e a inserção de DNA viral adjacente ao gene, ativando sua expressão via sequências regulatórias virais, são conhecidos por ativar a expressão

deste gene (COUTURIER et al. 1991; KINOSHITA et al. 1997; PETER et al. 2006; NAKANISHI et al. 2009). No entanto, a expressão de MYC é, na maioria das vezes, ativada indiretamente através de alterações das vias de sinalização que induzem ou reprimem a transcrição, sendo estes genes induzidos como uma resposta primária de, virtualmente, todas as vias de transdução de sinal conhecidas como alteradas no câncer, tais como aquelas governadas por receptores de tirosina-cinase, demonstradas anteriormente, além das vias de NF- κ B e da β -catenina (**Figura 5**).



Legenda: Desenho esquemático ilustrando as principais vias ativadoras de MYC por membros das famílias de Receptores de Tirosina Cinases (Via MAPK em roxo, STATs em verde, PI3K em laranja) e receptores *Frizzled* (ativadores da via da Wnt, à direita) e que geram a ativação e/ou aumento da estabilidade de fatores de transcrição MYC. À direita, esquematiza-se em maiores detalhes a ativação de MYC pela via Wnt, em que o triângulo vermelho indica o ligante (Wnt) que se acopla ao receptor *Frizzled*, que gera a hiperfosforilação da proteína *Dishevelled* e que, por sua vez gera o recrutamento de uma série de outras proteínas que culmina na hipofosforilação de β -catenina que se libera do complexo e se transloca para o núcleo (seta vermelha pontilhada), onde se acopla com o fator TCF (fator de transcrição) ativando a transcrição de genes alvo, tais como genes MYC.

Figura 5 - Principais vias ativadoras de MYC.

As proteínas MYC possuem dois Sinais de Localização Nuclear (NLS) e domínios estruturais que as caracterizam como fatores de transcrição. Os primeiros aminoácidos da porção N-terminal compreendem um domínio de transativação (TAD) e a porção C-terminal contém três domínios (bHLHzip):

uma região implicada no reconhecimento específico da sequência de DNA (BR ou região básica), uma região hélice-alça-hélice e uma região zíper de leucina, sendo as duas últimas responsáveis pela formação de heterodímeros entre MYC e seus ligantes (BOON et al. 2001; FARIA E RABENHORST 2006), sendo um dos ligantes essenciais para a maior parte das funções de MYC, a proteína MAX, outra proteína bHLHzip. Quando dimerizada com MYC, MAX funciona como ativadora da transcrição (NILSSON e CLEVELAND 2003; FARIA e RABENHORST 2006).

Muitos experimentos têm sugerido que os genes MYC atuam no ciclo celular, proliferação, metástase, no bloqueio da diferenciação e apoptose (BOON et al. 2001; SACHDEVA e MO 2009) e sua hiperexpressão influencia o *checkpoint* celular, permitindo a sobrevivência e a seleção de alguns tumores com maior grau de instabilidade genômica e fenótipos mais agressivos (SACHDEVA e MO 2009).

Utilizando linhagens celulares derivadas de carcinomas genitais invasivos, incluindo linhagens celulares de vulva, alguns estudos demonstraram a integração de DNA do vírus HPV 16 e 18 na posição cromossômica 8q24, a localização de C-MYC (COUTURIER et al. 1991; PETER et al. 2006) e na posição 2p24, que contém o gene N-MYC (NAKANISHI et al. 2009), indicando que o genoma viral é preferencialmente integrado próximo aos genes MYC em carcinomas genitais invasivos. Estes resultados suportam a hipótese de que a integração do HPV regula a progressão tumoral através da ativação de oncogenes como MYC e, ainda, corroboram as evidências da presença de transcritos derivados do HPV na

forma episomal na doença *in situ*, contra os transcritos de HPV integrados no *locus* MYC nas lesões invasivas (NAKANISHI et al. 2009).

Apesar do aumento da transcrição de c-MYC ser observada em estados pré-malignos e malignos, não foi demonstrada na literatura nenhuma relação entre este aumento da transcrição e grau e estágio tumorais (RIVIÉRE et al. 1990). Além disso, alterações nas sequências de MYC não parecem estar relacionadas aos carcinomas de células escamosas da vulva (TATE et al. 1994), sugerindo que maiores estudos devem ser realizados para determinar a significância real das alterações neste oncogene no carcinoma vulvar.

1.13.4 NDRG-1

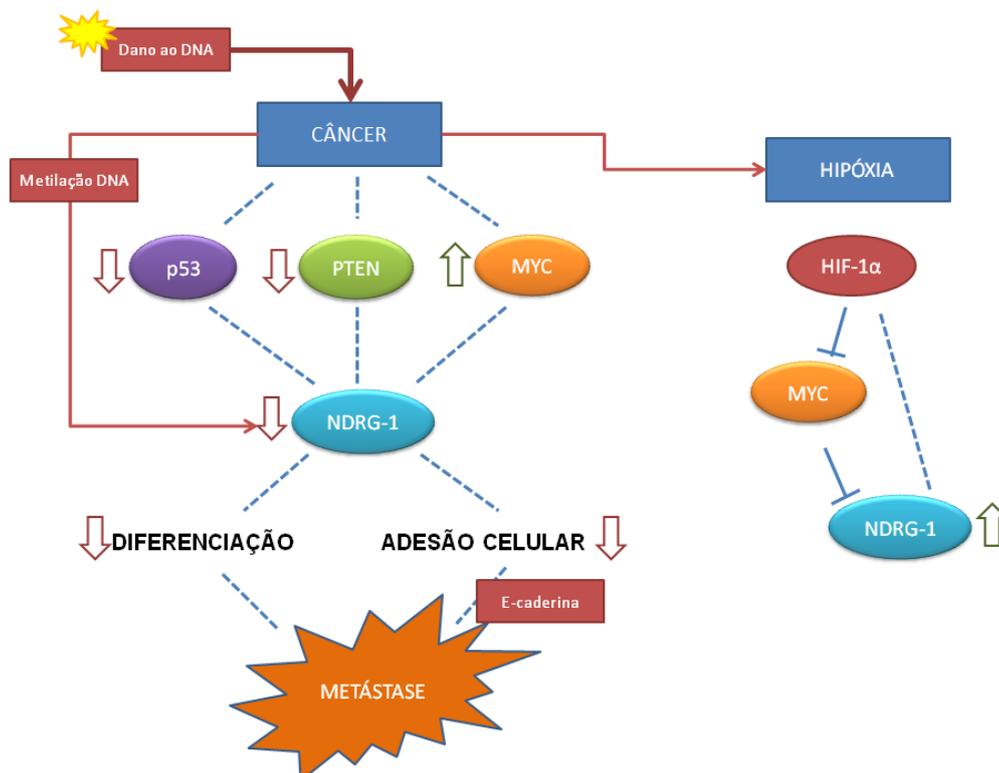
Gene regulado *downstream* por n-MYC 1 (NDRG-1), também conhecido como Drg-1, Cap43, RTP e RIT42 (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006) é membro da família NDRG, que pertence à superfamília α/β hidrolase (LCHAT et al. 2002) e da qual fazem parte outros três membros: NDRG-2, -3 e -4, com homologia nas sequências de aminoácidos em 57–65% umas com as outras (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006). Esta família é, ainda, subdividida em duas subfamílias, uma consistindo em NDRG-1 e NDRG-3 e outra em NDRG-2 e NDRG-4. O gene análogo em camundongos, NDR-1, também conhecido como TDD5, é altamente homólogo ao NDRG-1 humano, sugerindo que este gene está bem conservado entre espécies (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006).

NDRG-1 codifica uma proteína citoplasmática de 43-kDa composta de 394 aminoácidos (KOKAME et al. 1996; GERHARD et al. 2010), tendo sido identificada como supressora de metástase em tumores de próstata, cólon e mama (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006).

Este gene foi mapeado no cromossomo 8q24.2 (VAN BELZEN et al. 1998; KALAYDJIEVA et al. 1998; LCHAT et al. 2002), região comumente amplificada em vários tumores. Interessantemente, C-MYC está mapeado nesta região e é encontrado frequentemente amplificado no câncer, o que é uma informação significativa uma vez que este tem demonstrado capacidade de regular negativamente a expressão NDRG-1, o que pode contribuir para um fenótipo mais metastático do tumor (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006).

Várias condições, tanto fisiológicas quando patológicas - hipóxia, diferenciação celular, metais pesados, neoplasias e genes da família MYC - são responsáveis por modular a transcrição, tradução, bem como a estabilidade do mRNA de NDRG1 (LCHAT et al. 2002). No entanto, a função exata do produto protéico de NDRG-1 ainda não é clara. Dependendo do tecido, esta proteína pode localizar-se no citoplasma, núcleo, mitocôndrias ou membrana (KITOWSKA e PAWEŁCZYK 2010). Deste modo, as vias regulatórias que modulam este gene são diversas (**Figura 6**). NDRG-1 parece possuir papel citoprotetor sob situações de exposição a fatores de stress: dano ao DNA induz a expressão deste gene de modo dependente de p53; aumento da expressão do gene supressor de tumor PTEN também demonstrou regulação positiva de NDRG-1, sendo que

a inibição do primeiro gerou diminuição do segundo. A diminuição da expressão de NDRG-1 em tumores já foi demonstrada por diminuir uma molécula de adesão que está situada *downstream* na via de NDRG-1: E-caderina. Baixos níveis de E-caderina estão associados com maior potencial metastático e, por isso, NDRG-1 é chamado de inibidor de metástase. Oncogenes como C-MYC e N-MYC, frequentemente hiperexpressos nas neoplasias, diminuem sua expressão; transformação celular e progressão no ciclo e metilação do DNA também regulam NDRG-1 negativamente. Em contrapartida, HIF-1 α (Fator Induzido por Hipóxia) induz a expressão NDRG-1 sob hipóxia, gerando proteção celular à isquemia (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006; GERHARD et al. 2010).



Legenda: A figura ilustra, à esquerda, os mecanismos envolvidos na expressão de NDRG-1 no câncer, proveniente de dano ao DNA, no qual já é bem conhecida a diminuição da expressão de proteínas atuantes como supressoras tumorais (exemplo, p53 em roxo e PTEN em verde), em detrimento do aumento da atividade oncogênica como MYC (laranja). Estes 3 fatores, além da metilação do DNA (representado em um retângulo vermelho à esquerda), culminam com a diminuição da expressão de NDRG-1, sendo que esta diminuição parece estar relacionada à diminuição da diferenciação celular, da adesão celular, desencadeando metástases. Por outro lado, uma característica comumente observada no câncer, a hipóxia, resulta no aumento da expressão de NDRG-1, mostrado à direita, de modo dependente de HIF-1 α (círculo vermelho).

Figura 6 - Vias regulatórias de NDRG-1

No entanto, apesar da maior parte dos estudos terem identificado este gene hipoexpresso em tumores, alguns refutam estes dados. Estudos em câncer de próstata (CANGUL 2004) demonstraram aumento da expressão no tumor comparado ao tecido normal. Além disso, WANG et al. (2004) encontraram um aumento da expressão de NDRG-1 em tumores colorretais

em estágios mais avançados, levando à hipótese de que este gene é um promotor de metástases e não um supressor como inicialmente proposto. O fato de ser regulado positivamente por hipóxia pode ser a explicação do aumento da expressão nestes tumores, já que é uma condição comum no câncer. Sendo assim, torna-se clara a divergência na literatura no que tange este gene e mais estudos são necessários para elucidar seu papel (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006; GERHARD et al. 2010).

1.14 REVISÃO DA LITERATURA

Com o intuito de identificar as lacunas existentes na literatura em relação aos oncogenes em carcinoma de vulva, uma ampla revisão da literatura foi realizada através do PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) buscando por estudos relevantes específicos deste tipo de neoplasia, com as seguintes palavras-chave: *vulvar*, *vulva*, *vulvar cancer and vulval cancer*, seguido dos oncogenes de interesse e NDRG-1. Os dados obtidos estão no **Apêndice 1**.

OBJETIVOS

“Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought”.

–Albert Szent-Györgi

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações em oncogenes, bem como sua expressão protéica e correlacionar estas alterações com a presença de infecção pelo vírus HPV, para a determinação de valores prognósticos e preditivos em câncer de vulva.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudar a expressão imunoistoquímica dos seguintes oncogenes: HER-2, EGFR, c-KIT, c-MYC, n-MYC e NDRG-1;
- 2- Avaliar, através de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), translocações, deleções ou ampliações dos seguintes genes: HER-2, EGFR c-MYC e n-MYC;
- 3- Comparar os achados de imunoistoquímica com os resultados obtidos pelo FISH;
- 4- Comparar os dados de expressão protéica e de alterações dos oncogenes em questão com fatores prognósticos bem estabelecidos em anatomia patológica, sobrevida das pacientes, dados clínicos e tipos de HPV infectantes.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

"... scientific research is compounded of ... empirical procedures, general speculative ideas, and mathematical or abstract reasoning".

– James Bryant Conant

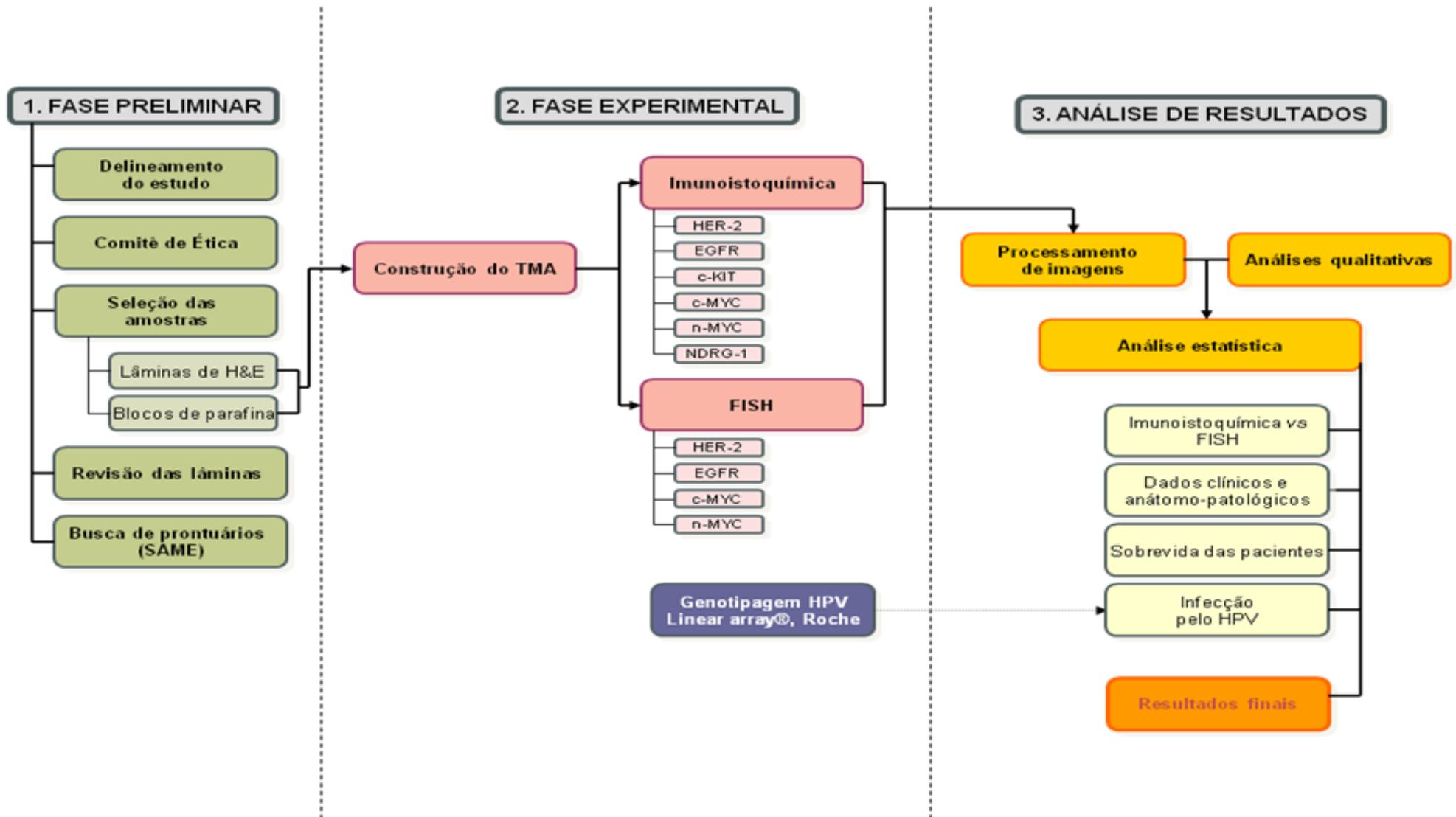


Figura 7 - Delineamento experimental do projeto

MÉTODOS

"Theory guides, experiment decides".

I.M. Kolthoff

4 MÉTODOS

4.1 PACIENTES E ESPÉCIMES ANATOMO-PATOLÓGICOS

Foram selecionados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo, de forma retrospectiva e aleatória, blocos de parafina de cento e trinta e nove carcinomas vulvares de diferentes subtipos histológicos provenientes de pacientes que sofreram intervenção cirúrgica de vulva neste hospital no período de 1979 a 2006.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão do presente trabalho foram pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide da vulva, que realizaram cirurgia e/ou biópsia no Hospital A.C.Camargo no período de 1979 a 2006.

Foram excluídas da casuística as pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma *in situ*, que realizaram tratamento neoadjuvante e aquelas cujos blocos de parafina não estavam disponíveis ou continham material insuficiente para as análises.

4.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Dados clínicos das pacientes foram coletados dos prontuários da Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos (SAME) do hospital, dentre

eles: idade, etnia, status menopausal, tamanho do tumor, grau nuclear, grau histológico, presença inflamação, componente *in situ* associado, status linfonodal, estadiamento, data de início do tratamento, tipo de tratamento, recidiva, local da recidiva, sobrevida livre de doença e tempo de sobrevida (**Apêndice 2**).

4.4 A CONSTRUÇÃO DOS MICROARRANJOS DE TECIDO (TMAS)

Todos os casos selecionados passaram por revisão de diagnóstico pela patologista Dra. Mônica Stiepcich, através da análise das lâminas de H&E correspondentes. As áreas representativas dos tumores foram selecionadas nas lâminas e foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor através do Manual Tissue *Arrayer* 1 (Beecher Instruments Micro-*array* technology, Silver Spring, USA) para a confecção dos TMAs. Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata nos TMAs, compreendendo regiões diferentes do tumor, e cortes seriados de 4 μ de espessura dos blocos dos TMAs foram depositados em lâminas carregadas eletricamente (Starfrost[®]). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas à - 20°C até o momento do estudo por IIQ e FISH. Um mapa contendo a localização detalhada de cada fragmento em cada um dos dois TMAs foi construído em planilha do Microsoft Excel[®].

4.5 A IMUNOISTOQUÍMICA (IIQ)

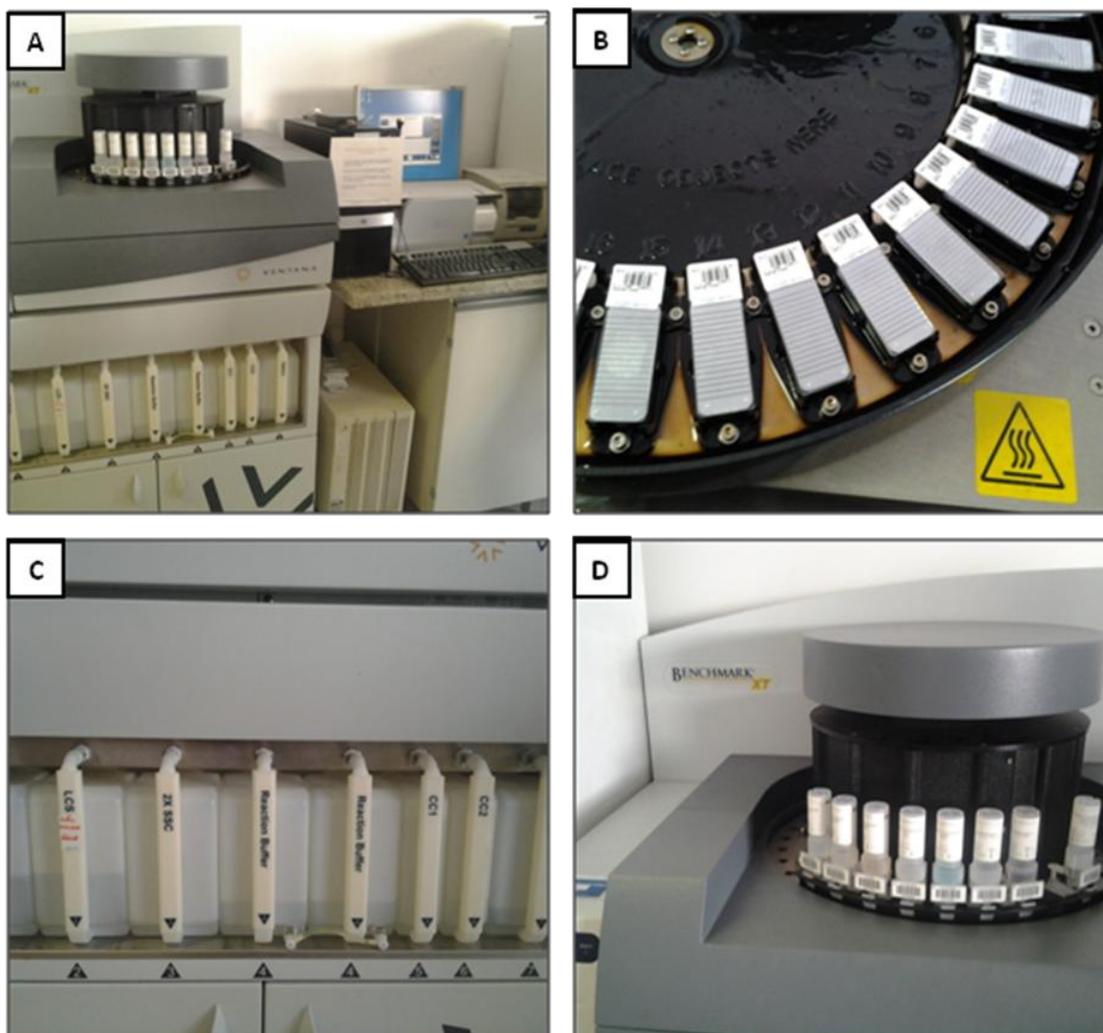
As lâminas de TMAs sem adesivo embebidas em parafina foram retiradas do freezer a -20°C e, após atingirem temperatura ambiente, foram colocadas na estufa a 60°C *overnight* para retirar o excesso de parafina. Em seguida, foram banhadas em xilol por 20 minutos.

A reação imunoistoquímica foi realizada de modo automatizado na plataforma Benchmark® - Ventana Medical Systems (Illkirch, Cedex, França), (**Figura 8**), que utiliza os seguintes reagentes:

a) FLUIDOS VOLUMOSOS: (1) *EZ PREP*: solução de desparafinização patenteada pela Ventana, livre de álcool e xilol e cuja formulação dos reagentes não está disponível. Juntamente com as placas aquecidas onde são depositadas as lâminas, é responsável pela desparafinização; (2) *LCS (Liquid Coverslip)*: Solução oleosa de baixa densidade responsável por formar uma câmara de reação sob o tecido de modo a permitir uma homogeneização dos reagentes sobre a lâmina, bem como não deixar que eles evaporem e ressequem durante o processo; (3) *CC1 (Cell Conditioning One)*: Solução tampão de pH levemente alcalino a base de TRIS usada como pré-tratamento no processamento de tecidos. Quando em alta temperatura, é capaz de romper as ligações covalentes formadas pela formalina no tecido, permitindo a reativação antigênica e aumentando a acessibilidade ao anticorpo. (4) *Reaction Buffer*: Solução de tampão pH 7,4 responsável por promover um ambiente aquoso para a

reação imunistoquímica e pela lavagem das lâminas entre os vários passos da reação.

b) KIT DE DETECÇÃO – *UltraView Universal DAB Detection Kit* - Trata-se de um kit contendo 5 dispensadores que conta com tecnologia baseada em sistema de detecção por múltimeros para a detecção sensível e específica de anticorpos primários de coelho e camundongo. O kit é livre de biotina, eliminando a marcação inespecífica proveniente da biotina endógena. Além dos componentes do kit de detecção, são acoplados à rack no momento da realização da técnica, dois dispensadores: (1) Hematoxilina: Hematoxilina de Mayer's modificada; e (2) *Bluing Reagent*: solução aplicada após a hematoxilina para fornecer uma contra-coloração à primeira.



Legenda: **A:** Visão geral do equipamento; **B:** Bandeja de lâminas com capacidade para 30 lâminas; **C:** Fluidos volumosos; **D:** Rack de reagentes recarregáveis (kit de detecção).

Figura 8 - Equipamento para confecção de imunohistoquímica de forma automatizada Ventana Benchmark

Previamente às reações nas lâminas de TMA, todos os anticorpos utilizados no estudo foram padronizados em cortes inteiros de tumores de vulva juntamente com controles positivos para cada tipo de proteína e estão ilustrados na **Tabela 5**.

A montagem das lâminas foi realizada de modo automatizado utilizando o equipamento TissueTek[®].

Tabela 5 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica.

ANTICORPO	FABRICANTE	CLONE	DILUIÇÃO	TECIDO CONTROLE
c-KIT	DAKO	A4502/Policlonal de Coelho	1:100	Pele
c-MYC	SantaCruz	Sc-40/ Monoclonal de Camundongo	1:50	Mama
EGFR	Zymed	31G7/Monoclonal de Camundongo	1:20	Mama sabidamente positiva para EGFR
HER-2	Ventana	(PATHWAY [®] HER2/neu) 4B5/ Monoclonal de Coelho	Pronto para Uso	Mama sabidamente positiva para HER-2
NDRG1	Abgent	AT2991A/ Monoclonal de Camundongo	1:1000	Intestino
n-MYC	SantaCruz	NCMII 100/ Monoclonal de Camundongo	1:100	Neuroblastoma

4.6 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Após a realização da IIQ, todas as lâminas de TMA foram digitalizadas em equipamento digitalizador de lâminas (APERIO®) e avaliadas visualmente. Para esta avaliação, foram utilizados escores previamente descritos na literatura por outros autores e estes serão abordados a seguir.

A análise da expressão protéica de HER-2 foi realizada de acordo com o recomendado pelo Guia de recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ Colégio Americano de Patologistas (ASCO/CAP) para o teste de HER-2 em câncer de mama (**Tabela 6**). Ausência de marcação de membrana ou marcação em menos de 10% das células tumorais foi considerado escore 0 – negativo. Marcação fraca de membrana, incompleta em mais de 10% das células tumorais, escore 1+; marcação fraca ou moderada de membrana completa em mais de 10%, escore 2+; marcação forte de membrana delimitada completa em mais de 30% das células foi considerado escore 3+.

Tabela 6 - Classificação da expressão de HER-2 (Guia de recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ Colégio Americano de Patologistas (ASCO/CAP)

Escore	Imunoexpressão de HER-2	Padrão de marcação
0	Negativo	Nenhuma marcação de membrana em <10% das células tumorais
1+	Negativo	Marcação fraca de membrana, incompleta em qualquer proporção de células ou completa em <10% das células
2+	Indeterminado	Membrana completa de marcação fraca ou moderada em >10% das células tumorais ou intensa e completa em >30% das células
3+	Fortemente positivo	Marcação intensa, uniforme e completa de membrana em >30% das células

Para a avaliação da imunoexpressão de EGFR, a intensidade absoluta de marcação imunoistoquímica de membrana foi observada como proposto por estudos realizados por GROWDON et al. (2008), BRUSTMANN (2007), BERCHUCK et al. (1990) e OONK et al. (2007) em carcinomas de vulva, em que foi considerado escore 0 para os casos com ausência de marcação de EGFR na membrana; escore 1+ naqueles com marcação fraca deste receptor na membrana; escore 2+ para marcação moderada e 3+ para marcação forte de membrana.

Em relação ao produto protéico de c-KIT, foi realizada avaliação na membrana celular e citoplasma, sendo graduada como proposto por HASIGAWA (2004), que se baseia em dois parâmetros: intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas. Os casos foram pontuados de acordo com a intensidade de marcação em 0 = negativo; 1 = marcação fraca; 2 = marcação moderada; 3 = marcação forte e de acordo com a

porcentagem de células marcadas em: (a) marcação esporádica = menos de 10% das células positivas; (b) marcação focal = quantidade maior ou igual a 11% e menos de 50% das células marcadas; (c) marcação difusa = mais de 50% das células positivas. Intensidades de marcação 2+ ou 3+ com porcentagem de marcação focal e difusa foram consideradas positivas.

A proteína c-MYC foi avaliada quanto à reatividade no citoplasma como descrita por LIU et al. (2008), também em relação à porcentagem de células marcadas e intensidade de imunorreatividade: (a) Porcentagem de células marcadas: 1 = menos de 15%; 2 = de 15 a 50%; 3 = mais de 50%. (b) Intensidade: 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa. O escore final foi dado pela multiplicação da quantidade pela intensidade de imunorreatividade no citoplasma. Casos com um escore final menor que 4 foram considerados negativos. Já os que possuíram escore maior ou igual a 4, foram considerados positivos. Além disso, positividade e negatividade de qualquer marcação nuclear também foram avaliadas.

Tanto as avaliações semiquantitativas de n-MYC quanto de NDRG-1 foram realizadas em escala de quatro pontos de acordo com os critérios adotados por WANG et al. (2004) e GERHARD et al. (2010) padronizados para NDRG-1, levando-se em conta: (1) a proporção de células marcadas, graduadas como: 0 = menos de 5% das células marcadas; 1 = marcação de 6-25% das células; 2 = de 26-50% das células marcadas; 3 = 51-75% e 4 = marcação positiva em mais de 75% das células; (2) a intensidade de marcação: 0 = ausência de cor; 1 = coloração fraca; 2 = coloração moderada; 3 = coloração forte. Um escore combinado da porcentagem de

células marcadas multiplicado pela intensidade de marcação foi utilizado para avaliar os resultados da marcação de NDRG-1 e n-MYC: Escore final 0 = negativo; 1 ou 4 = (+); 5 ou 8 = (++); 9 ou 12 = (+++).

O uso do mesmo critério de avaliação de NDRG-1 foi expandido para n-MYC devido à falta de dados na literatura a respeito da avaliação deste marcador em tecido emblocado em parafina. n-MYC, assim como muitos outros produtos de proto-oncogenes, é uma proteína nuclear de meia-vida curta, entre 30 e 50 minutos (BONVINI et al. 1998) e, por este motivo, adota-se o uso de material congelado para a análise da expressão protéica da mesma. No entanto, pela indisponibilidade deste tipo de material para as reações imunistoquímicas no presente projeto, foi realizada a análise de marcação de n-MYC no citoplasma, visto que é sabido na literatura que a meia-vida de n-MYC pode ser prolongada na presença de sinais de degradação alterados, levando a um aumento de sua estabilidade na célula (COHN et al. 1990; BONVINI et al. 1998).

4.7 A HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Os ensaios de FISH foram realizados através de sondas específicas para cada gene: HER-2 (*Vysis PathVysion HER2 DNA Probe Kit™*, Abbott™), EGFR (*ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe*, ZytoVision®), c-MYC (*Vysis LSI IGH/MYC/CEP-8 Dual Fusion Probe*, Abbott™) e n-MYC (*LSI® N-myc SpectrumOrange*, Vysis™).

Após a desparafinização em três lavagens com xilol 100% de 10 minutos cada, as lâminas de TMA foram reidratadas por meio de três lavagens com álcool 100% de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com água destilada (três lavagens de 2 minutos cada), 0,2mmol/L de HCl por 20 minutos à temperatura ambiente e submetidas a um pré-tratamento em citrato pH 6,0 por 60 minutos a 82°C. A digestão enzimática foi realizada com pepsina (pronto para uso) por 8 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em tampão 2xSSC por 2 minutos (SSC: 0.3 mmol/L de cloreto de sódio e 0.03 mmol/L de citrato de sódio). Em seguida, foi realizada a desidratação com três mudanças consecutivas de álcool a 75%, 80%, e 100%, por 2 minutos cada. As lâminas foram secadas ao ar e incubadas com 10µl das sondas previamente citadas e colocadas no hibridizador StatSpin Hybridizer (DAKO) por 44 horas. Depois, foram mergulhadas em solução de Uréia/0,1 x SCC por 3 minutos a 45°C e lavadas em solução 2xSSC por 2 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram desidratadas em álcool 75%, 80%, e 100% por 2 minutos cada e secadas ao ar. Após a aplicação de 15µl de DAPI (SSC 2X/0,03 ug/mL 4',6-diaminido-2-fenilindoleidrocloreto), foram montadas com lamínula.

4.8 AVALIAÇÃO DO FISH

Os TMA foram digitalizados no equipamento Ariol® e analisados de modo visual de acordo com as recomendações dos fabricantes, descritas a

seguir, sendo utilizado o tecido de placenta localizado no primeiro *spot* do TMA como controle da reação para todas as análises.

A avaliação do FISH para HER2- foi realizada de acordo com o Guia de recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ Colégio Americano de Patologistas para o teste de HER-2 em câncer de mama. Nesta análise, avalia-se a razão entre a marcação do gene HER-2 (17q11-12), em vermelho, e a região centromérica do cromossomo 17, em verde (HER-2/CEP17). Para cada *spot* do TMA, 60 núcleos celulares interfásicos não-sobrepostos foram avaliados e a razão HER-2/CEP17 foi obtida. Esta razão define como amplificação uma razão HER-2/CEP17 maior ou igual a 2.2 e polissomia os casos com razão HER-2/CEP17 menor ou igual a 1.8 (WOLFF et al. 2007).

Na análise de expressão gênica de EGFR, a sonda *SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe* marca o gene EGFR (7p12) em verde e em laranja a região centromérica do cromossomo 7. A análise da razão EGFR/CEP7 foi realizada como previamente descrita na literatura em carcinomas de vulva (GROWDON et al. 2008), com contagem de 50 núcleos interfásicos não-sobrepostos em que dissomia foi considerada como uma razão EGFR/CEP7 igual a 1.0; alta polissomia foi definida como 4 ou mais cópias do cromossomo e amplificação gênica como a presença de *clusters* gênicos e uma razão EGFR/CEP7 maior ou igual a 2.0.

A sonda *Dual Fusion Probe* para c-MYC é usada para detectar, além de alterações numéricas e ampliações do gene, translocações. Quando translocado, c-MYC encontra-se comumente na região do gene da IGH

(cadeia pesada da imunoglobulina). A análise de translocações é possível pelo fato desta sonda marcar o gene c-MYC em laranja (8q24), a região do centrômero do cromossomo 8 (8q11.1-q11.1) em azul e a região 14q32 (IGH) em verde. Foram avaliados cerca de cem núcleos interfásicos não sobrepostos e foi considerada dissomia núcleos com seis sinais distintos, sendo 2 verdes, 2 laranjas e 2 azuis. Foram consideradas células com translocação aquelas contendo 2 sinais azuis (região centromérica) acompanhados de sinais verdes e laranja fusionados, gerando sinais amarelados. Polissomia foi definida como a presença de 3 sinais a mais do gene c-MYC do que sinais centroméricos; amplificação foi considerada como a presença de mais de 3 sinais do gene c-MYC do que sinais centroméricos e/ou presença de *clusters* do gene c-MYC (SCHLEGER et al. 2002).

A sonda LSI[®] N-myc SpectrumOrange para n-MYC possui apenas o sinal laranja, indicando a região do gene em 2p23-24. Foram analisados cerca de 100 núcleos interfásicos não sobrepostos e considerou-se dissomia a presença de um ou dois sinais para cada cromossomo 2 e amplificação a presença de mais de dois sinais laranjas, de acordo com indicação do fabricante.

4.9 GENOTIPAGEM DE HPV

O teste de genotipagem de HPV foi realizado em 105 amostras de carcinoma de vulva por uma aluna de doutorado deste mesmo grupo. O teste utilizado, Linear Array HPV da Roche, é um teste qualitativo *in vitro*,

que utiliza amplificação do DNA alvo através de reação de polimerização em cadeia e hibridação de ácidos nucléicos e detecta 37 genótipos de DNA anogenitais, dentre eles HPV's de alto risco (tipos 16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58, 59,66,68 e 82); de baixo risco (HPV's tipos 6,11,40,42,54,61,70,72,81 e CP6108); e HPV's de risco ainda indeterminado (55,62,64,67,69,71,73,83,84 e IS39 – HPV82). Este teste baseia-se nos seguintes processos principais: preparação da amostra (isolamento de DNA e purificação); amplificação por PCR do DNA alvo usando iniciadores para o HPV; hibridação dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica, em fita, como descrito a seguir.

4.9.1 Isolamento de DNA genômico de tecidos

Foram realizados quatro cortes de 5 mm do material tumoral do bloco parafinado. Esses cortes foram colocados em microtubos, adicionando-se 180 µL do tampão ATL e 20µL de Proteinase K. Em seguida, esse material foi colocado em termomixer e incubado a 56°C *overnight*. Foram adicionados 200 µL do tampão AL e 110 µL de etanol absoluto e incubados. O material foi, então, transferido para uma coluna específica (QIAamp MinElute Collumn), que passou por centrifugação. Foram adicionados nesta coluna 500 µL de tampão AW1 e AW2 e para cada coluna específica foram aplicados, no centro da membrana, 20 a 100µl de tampão AE, deixando o material incubado em temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a 20.00 xg por 1 minuto e retirada a coluna. O DNA extraído foi quantificado

no equipamento Nanodrop em comprimento de onda 260/280 e 260/230 e a sua qualidade foi checada em gel de agarose.

4.9.2 Amplificação por PCR

A seleção do alvo foi feita através de iniciadores biotinilados para definir uma sequência de nucleotídeos dentro da região polimórfica L1 do genoma do HPV. Um par de iniciadores adicional visa o gene β -globina humana para proporcionar um controle do isolamento de DNA e amplificação.

4.9.3 Reação de Hibridação

Após a amplificação por PCR, o amplicon do HPV e da β -globina foram desnaturados quimicamente para formar um DNA de fita simples, através da adição de Solução de Desnaturação. As alíquotas do amplicon desnaturado foram, depois, transferidas para o reservatório adequado da bandeja de tipagem contendo o tampão de hibridação e uma única tira de Genotipagem Linear Array HPV, que é revestida com bandas da sonda para os HPVs e β -globina.

4.9.4 Fase de Detecção

Após hibridação, a Tira de Genotipagem foi rigorosamente lavada, e foi adicionado o conjugado Estreptavidina-peroxidase, que se liga ao amplicon marcado com biotina. Na presença de peróxido de hidrogênio, a estreptavidina que se encontra ligada catalisa a oxidação e forma um

complexo de coloração azul, que precipita nas posições da sonda onde ocorre a hibridação. As tiras foram, depois, lidas visualmente.

4.10 A ANÁLISE ESTATÍSTICA

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). Com fins estatísticos, alguns agrupamentos de escores imunoistoquímicos ou foram realizados.

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 nível de significância adotado foi o de 5% ($p=0,05$). 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>).

RESULTADOS

*"I pass with relief from the tossing sea of Cause and Theory
to the firm ground of Result and Fact".
Sir Winston Spencer Churchill*

5 RESULTADOS

A apresentação dos resultados será dividida em uma seção abordando a caracterização da amostra de estudo, na qual a busca e análise detalhada dos prontuários das pacientes (n=139) nos permitiram obter uma ampla gama de dados demográficos e características clínico-patológicas dos tumores; e uma seção de abordagem da avaliação dos oncogenes HER-2, EGFR, c-MYC, n-MYC, c-KIT e NDRG-1 em carcinomas de vulva.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE ESTUDO

5.1.1 Dados Demográficos

As pacientes do presente estudo apresentaram uma média de idade de 69 anos (desvio padrão: 12), variando de 15 a 98 anos e com uma mediana de 71 anos. A maior parte das pacientes pertenceu ao grupo de faixa etária correspondente às idades entre 70 e 80 anos (54,67%), como mostrado na **Figura 9**. Em relação à raça, a maior parte das pacientes era branca (86,3%), seguida da raça parda (9,35%) e negra (1,43%). Quanto ao estado civil, a maioria se declarou casada (50,30%), seguido de viúvas (37,70%), solteiras (8,80%) e separadas (3%). Já em relação à escolaridade, a quase totalidade das mulheres (78,37%) era analfabeta ou possuía primeiro grau incompleto. A distribuição das pacientes portadoras de

carcinoma de vulva submetidas à ressecção cirúrgica segundo idade, raça, estado civil e escolaridade está disposta na **Tabela 7**.

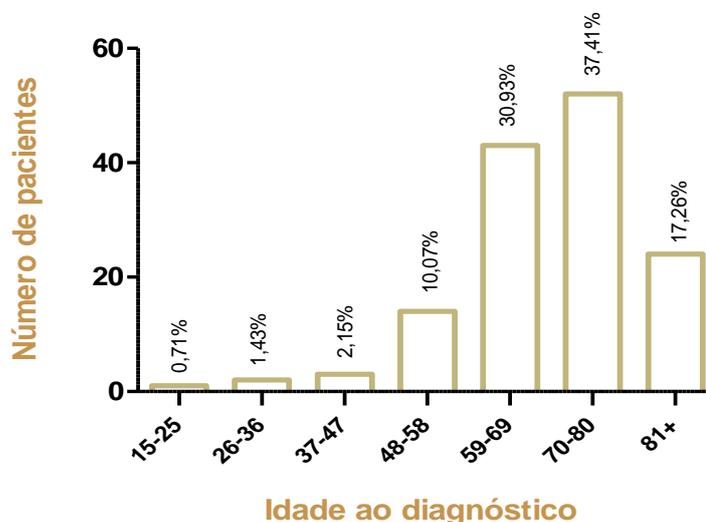


Figura 9 - Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma de vulva por faixas etárias

Tabela 7 - Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma de vulva submetidas à ressecção cirúrgica segundo idade, raça, estado civil e escolaridade (São Paulo, 2011).

Características sócio-demográficas			
Idade			
	Média	69	
	Mediana	71	
	Desvio Padrão	12	
	Mínimo	15	
	Máximo	98	
Raça		N	%
	Branca	120	88,8
	Não Branca	15	11,2
Estado Civil			
	Solteira	12	8,95
	Casada	67	50,0
	Separada	4	2,90
	Viúva	51	38,05
Escolaridade			
	Analfabeta	38	34,23
	1º grau incompleto	49	44,14
	1º grau completo	1	0,90
	2º grau incompleto	13	11,70
	2º grau completo	6	5,40
	Superior completo	4	3,60

Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença foram traçadas em relação à escolaridade das pacientes e estão demonstradas na **Figura 10 e Tabela 8**.

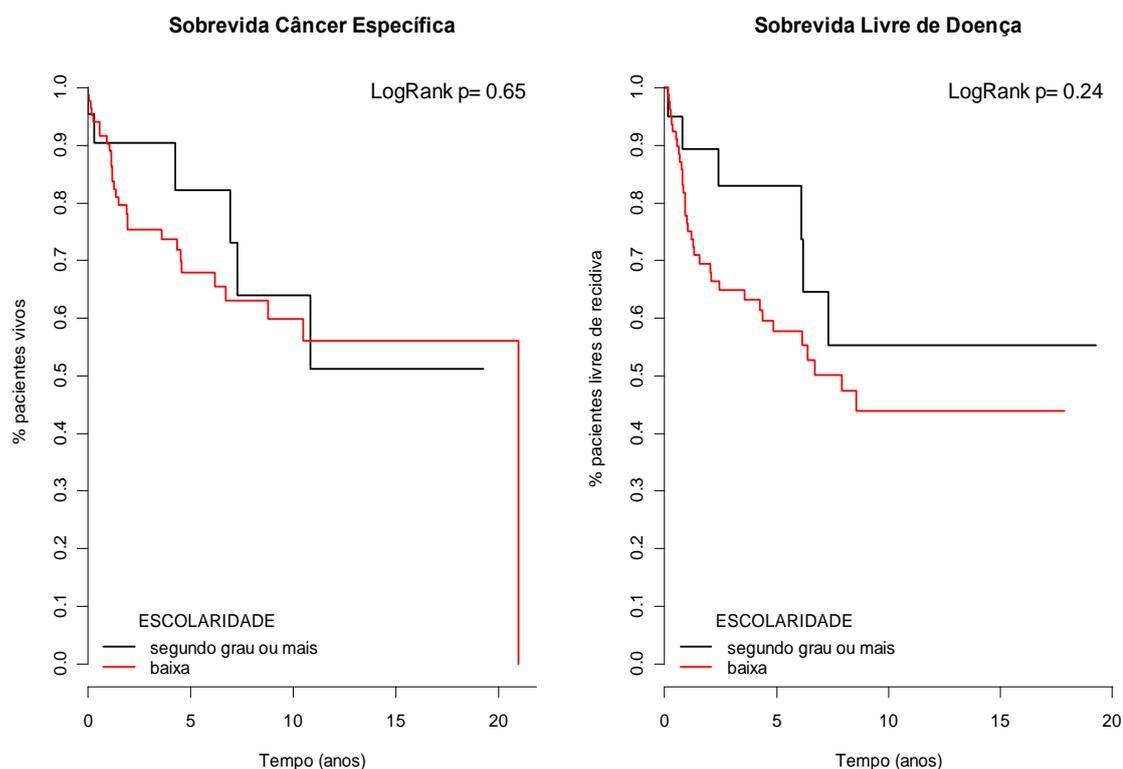


Figura 10 - Curvas de sobrevida Câncer específica e livre de doença em relação aos diferentes graus de escolaridade dentre as pacientes com carcinoma de vulva

Tabela 8 - Sobrevida Câncer Específica em 5 anos em relação ao grau de escolaridade das pacientes

Sobrevida em 5 anos	Grau de escolaridade	SCE			SLD		
		n	RR	P	n	RR	p
Escolaridade	Analfabetas/Primeiro grau	22	1.23	0.65	85	1.67	0.24
	Segundo grau ou mais	88	1		20	1	

Legenda:

RR: Risco Relativo

5.1.2 Dados Clínicos das Pacientes

Os dados clínicos obtidos dos prontuários das pacientes (**Tabela 9**) demonstraram uma média de idade da menarca em 14 anos, variando entre idade mínima de 10 e máxima de 20 anos e com uma mediana de 13 (desvio padrão: 2). Em relação à menopausa, a média de idade foi de 48 anos, com mediana de 50 anos (desvio padrão: 9,83), sendo a idade máxima de 64 anos, sendo que 3 pacientes ainda estavam no menacme. A média de idade da primeira relação sexual declarada pelas pacientes foi de 19 anos, com mediana de 19 anos (desvio padrão: 7,02) sendo a idade mínima de 11 e máxima de 43 anos. Quanto ao número de gestações, a média foi de 6 gestações, com mediana de 5 (desvio padrão: 0,61) e uma média de partos de aproximadamente 5 partos, com mediana de 5 (desvio padrão: 4). Em relação a abortos, a maioria das pacientes declarou não ter tido nenhum aborto (57,60%), seguido de 1 aborto (19,20%), 2 abortos (16,0%) e 3 ou mais abortos (7,20%). A maior parte das mulheres do nosso estudo declarou ter tido apenas um parceiro sexual durante a vida (87,69%), seguido de nenhum parceiro (6,15%), dois (3,07%) e quatro parceiros (3,07%). Finalmente, relacionado ao uso de anticoncepcionais, 94,40% das pacientes declararam nunca ter feito uso destes e 5,50% fizeram uso no passado.

Tabela 9 - Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma de vulva quanto aos dados clínicos (São Paulo, 2011)

Características clínicas das pacientes			
Menarca			
	Média		14
	Mediana		13
	Desvio Padrão		2
	Mínimo		10
	Máximo		20
Menopausa			
	Média		48
	Mediana		50
	Desvio Padrão		9,83
	Mínimo		38
	Máximo		64
Coitarca			
	Média		18,61
	Mediana		20
	Desvio Padrão		7,78
	Mínimo		11
	Máximo		43
Gestações			
	Média		6
	Mediana		5
	Desvio Padrão		0,61
	Mínimo		0
	Máximo		18
Partos			
	Média		5
	Mediana		5
	Desvio Padrão		4
	Mínimo		0
	Máximo		16
		N	%
Abortos			
	0	72	57,60
	1	24	19,20
	2	20	16,0
	3 ou mais	9	7,20
Parceiro			
	0	4	6,15
	1	57	87,69
	2	2	3,07
	4	2	3,07

Os sintomas mais comumente relatados pelas pacientes do estudo estão demonstrados na **Figura 11**. Prurido foi o mais comum (34,28%), seguido por ulceração (26,07%) e presença de tumoração (19,28%). Sangramento (9,28%), secreção (5,0%), dor vulvar (3,57%) e disúria (2,50%), ainda que presentes, foram menos comuns. O tempo médio de duração dos sintomas relatados pelas pacientes foi de 11 meses, com mediana de 6 meses, variando de 15 dias a 10 anos de duração (SD:16,67).

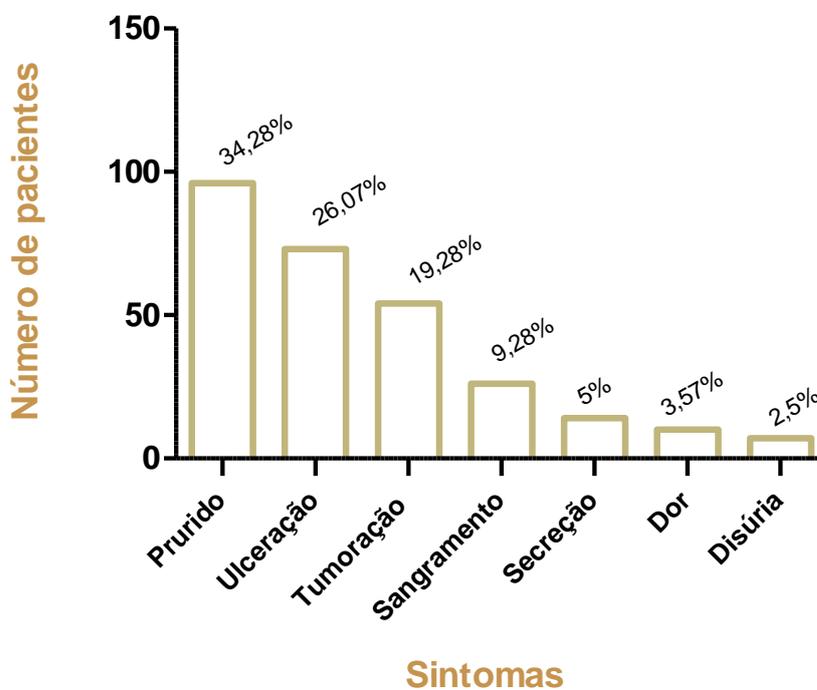


Figura 11 - Distribuição dos sintomas mais comumente relatados pelas pacientes com carcinoma de vulva

5.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANATOMO-PATOLÓGICA DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

Em relação aos dados anatomo-patológicos dos tumores, grande parte da amostra foi constituída de peças cirúrgicas (79,1%), seguido de biópsias (15,2%) e revisões de lâminas com blocos de parafina disponíveis (5,7%). Os tumores tiveram média de tamanho de 4,5cm, com mediana de 4,0 cm (SD=2,63), variando de 0,3 a 18 cm em sua maior dimensão. A maior parte dos tumores (**Tabela 10**) foi classificado como CEC 2 (43,88%), seguido de CEC1 (33,81%), CEC 3 (10,07%), carcinomas basalóides (9,35%) e carcinomas verrucosos e sarcomatóides (1,44% cada). Quanto à sobrevida, quando comparada em relação aos tipos histológicos bem diferenciados (CEC 1 e carcinoma verrucoso) e os moderadamente e pouco diferenciados (CEC2, CEC3 e carcinomas basalóides), houve uma pior sobrevida livre de doença dos tumores do segundo grupo (57% de sobrevida livre de recorrência) em relação aos do primeiro (79%), como demonstrado na **Figura 12** ($p=0,05$). Os diferentes tipos histológicos encontrados estão ilustrados na **Figura 13**.

Outras características anatomo-patológicas dos tumores foram avaliadas: em relação à profundidade de invasão, 20,78% infiltraram a derme superficial, 54,55% dos tumores infiltraram a derme profunda e 24,68% infiltraram o tecido subcutâneo. Infiltrado inflamatório moderado foi o mais comumente observado (62,6%). Na maior parte dos tumores não foram identificadas invasão vascular (84,89%) ou perineural (89,21%). Em relação

à metástase linfonodal, 71,94% dos casos em que houve abordagem cirúrgica dos linfonodos (linfadenectomias), não apresentaram linfonodos acometidos, ao passo que 28,06% tiveram algum grau de acometimento linfonodal. Tanto a sobrevida câncer específica quanto livre de doença das pacientes com presença de metástases linfonodais foram menores em relação às que não apresentaram este evento, como mostrado na **Figura 14**. Pacientes sem metástase linfonodal tiveram uma sobrevida câncer específica e livre de doença de 88% e 83%, respectivamente ($p=0,03$), ao passo que as pacientes que tiveram metástases linfonodais mostraram sobrevidas de 59 e 54%, respectivamente ($p=0,05$).

Tabela 10 - Distribuição das amostras em relação às características anatomo-patológicas dos tumores (São Paulo, 2011).

<i>Características anatomo-patológicas dos tumores</i>			
Diagnóstico		n	%
	CEC 1	47	33,81
	CEC 2	61	43,88
	CEC 3	14	10,07
	Ca Basalóide	13	9,35
	Ca Verrucoso	2	1,44
	Ca Sarcomatóide	2	1,44
Profundidade da Invasão			
	Derme superficial	16	20,78
	Derme profunda	42	54,55
	Subcutâneo	19	24,68
Infiltrado inflamatório			
	Leve	16	13,68
	Moderado	87	74,36
	Intenso	14	11,97
Invasão			
	Vascular Não	118	84,89
	Sim	21	15,11
	Perineural Não	124	89,21
	Sim	15	10,79
Metástase Linfonodal			
	Ausente	100	71,94
	Presente	39	28,06

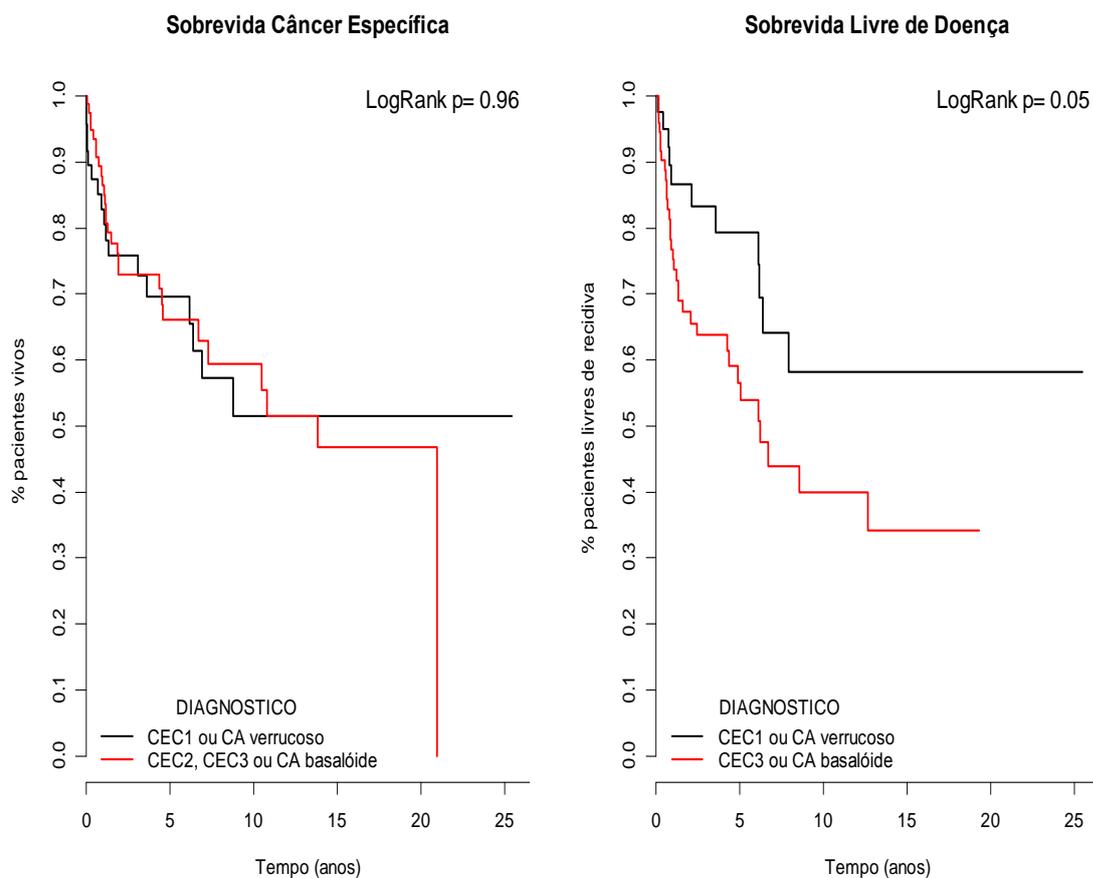


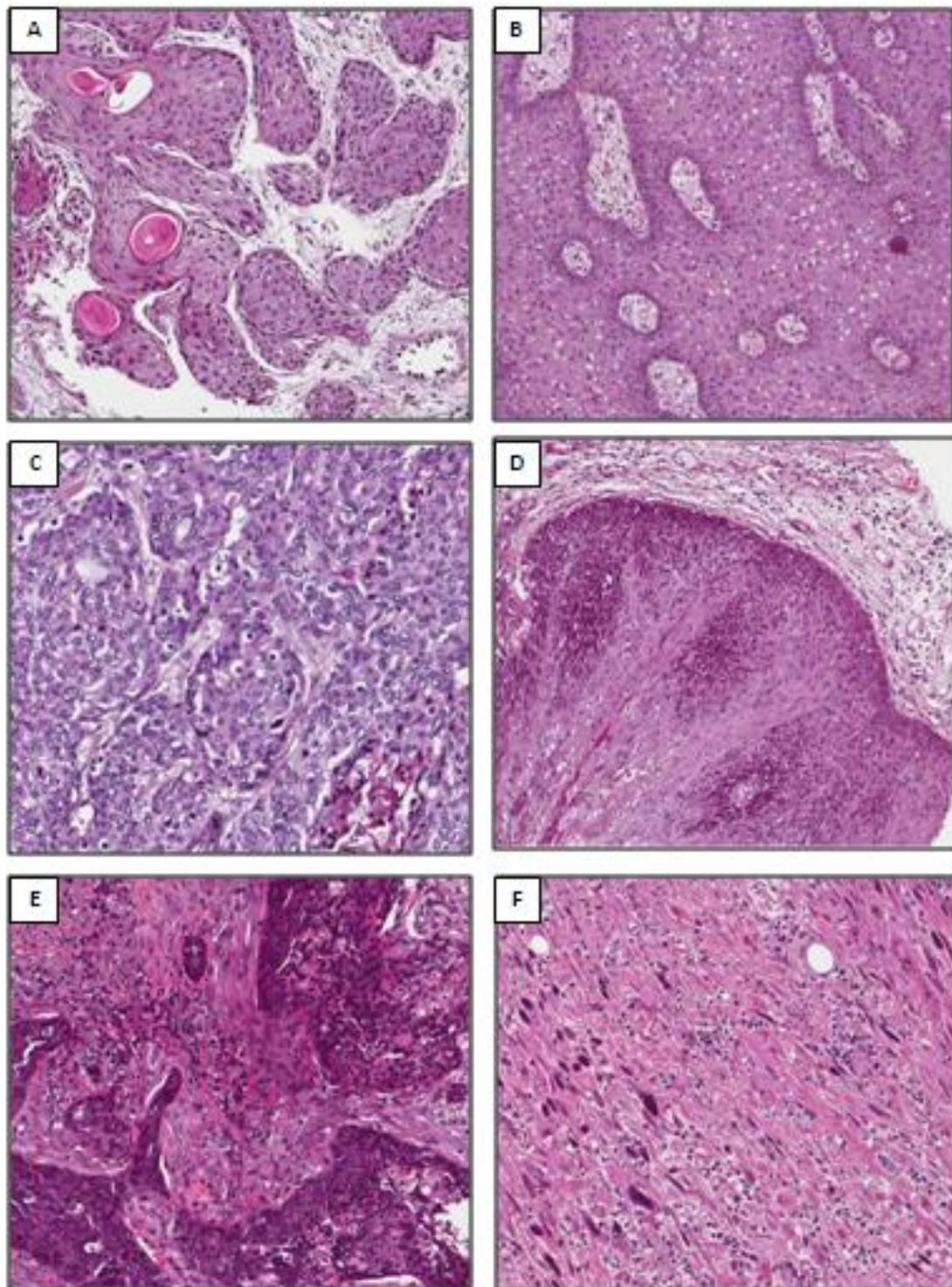
Figura 12 - Curvas de sobrevida global em relação aos diferentes tipos histológicos dos tumores de vulva

Tabela 11 - Sobrevidas Câncer Específica e Livre de doença em 5 anos em relação ao diagnóstico histopatológico dos tumores.

Sobrevida em 5 anos	Tipo histológico	SCE			SLD		
		n	RR	p	n	RR	p
Diagnóstico	CEC1 ou ca verrucoso	48	1.00	0.96	42	1.00	0.05
	CEC2, CEC3 ou ca basalóide	81	0.98		74	1.97	

Legenda:

RR: Risco Relativo



Legenda: **A:** CEC 1; **B:** CEC 2; **C:** CEC 3; **D:** Carcinoma verrucoso; **E:** Carcinoma basalóide; **F:** Carcinoma sarcomatóide.

Figura 13 - Lâminas de H&E evidenciando os diferentes tipos histológicos de carcinomas de vulva (Em aumento de 40x).

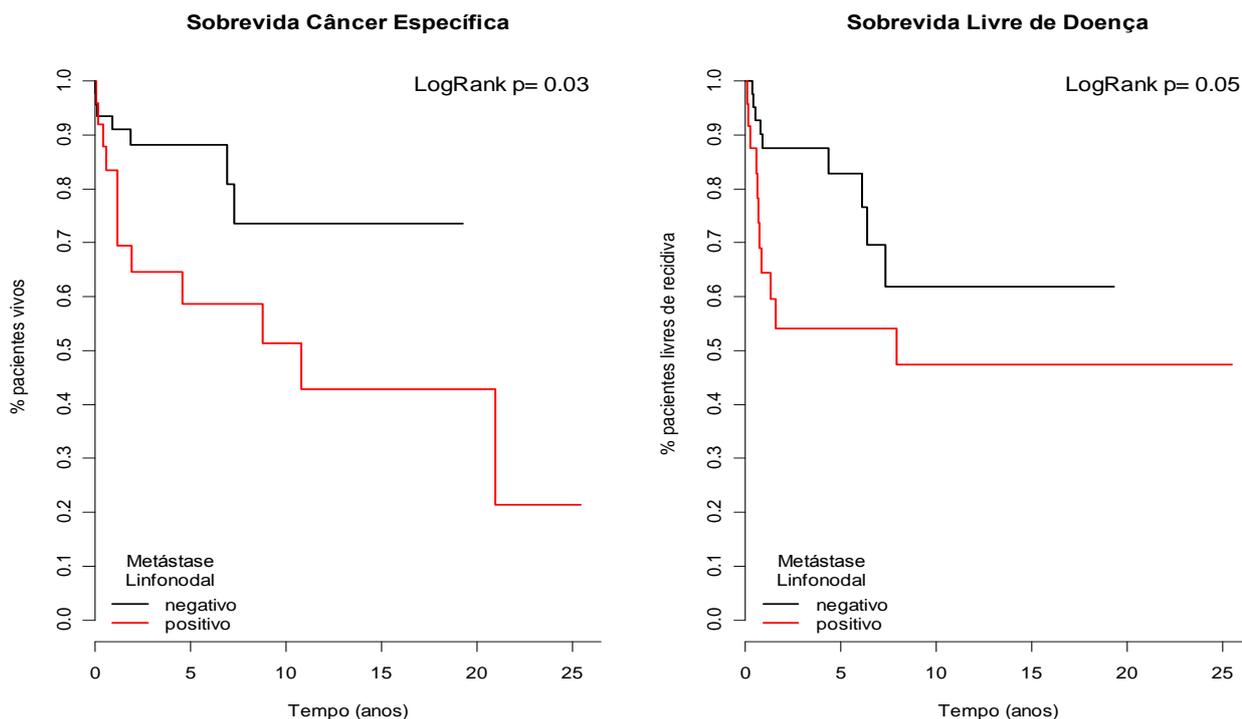


Figura 14 - Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação à metástase linfonodal

Tabela 12 - Sobrevida câncer específica e livre de doença em 5 anos em relação à presença de metástases linfonodais.

Sobrevida em 5 anos	Metástase linfonodal	SCE			SLD		
		n	RR	P	n	RR	p
Metástase linfonodal	Não	47	1	0.03	46	1	0.05
	Sim	26	2.78		25	2.41	

Legenda:

RR: Risco Relativo

Algumas características clínicas dos tumores foram analisadas no presente projeto e em relação à localização dos mesmos, a mais comum foram os pequenos lábios (40,52%), seguida dos grandes lábios (30,83%), clitóris (22,02%) e períneo (6,60%), como mostra a **Figura 15**. Quanto à lateralidade, grande parte dos tumores era unilateral (71,85%), seguido dos

tumores bilaterais (16,29%). Cerca de 12% acometiam a linha média da vulva.

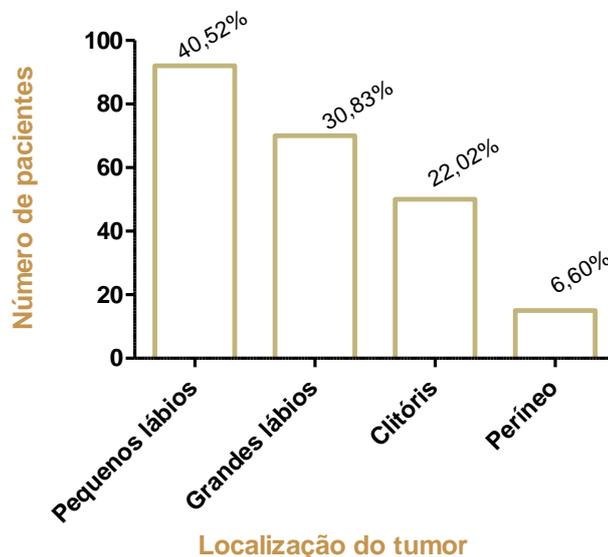


Figura 15 - Distribuição dos tumores do estudo em relação à localização

Dentre a nossa casuística, a maior parte dos tumores foi classificada como estadiamentos FIGO IB (58,91%) e IIIB (19,37%), como demonstrado na **Figura 16**. Pacientes cujos tumores apresentaram estadiamento III apresentaram, com nível de significância marginal ($p=0,07$), sobrevida câncer específica de 59%, sendo esta menor que a das pacientes com tumores FIGO I (sobrevida de 81%) ou II (sobrevida de 88%), como mostrado na **Figura 17**. Observou-se aumento do risco relativo em relação à sobrevida câncer específica acompanhado do aumento do estágio do tumor, também com significância marginal.

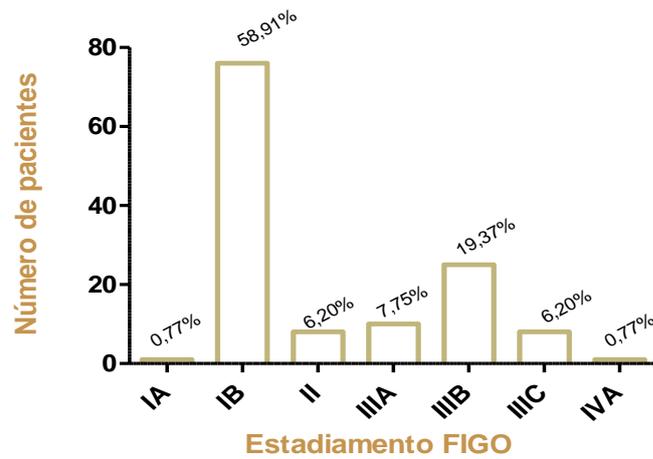


Figura 16 - Distribuição dos tumores em relação ao estadiamento FIGO

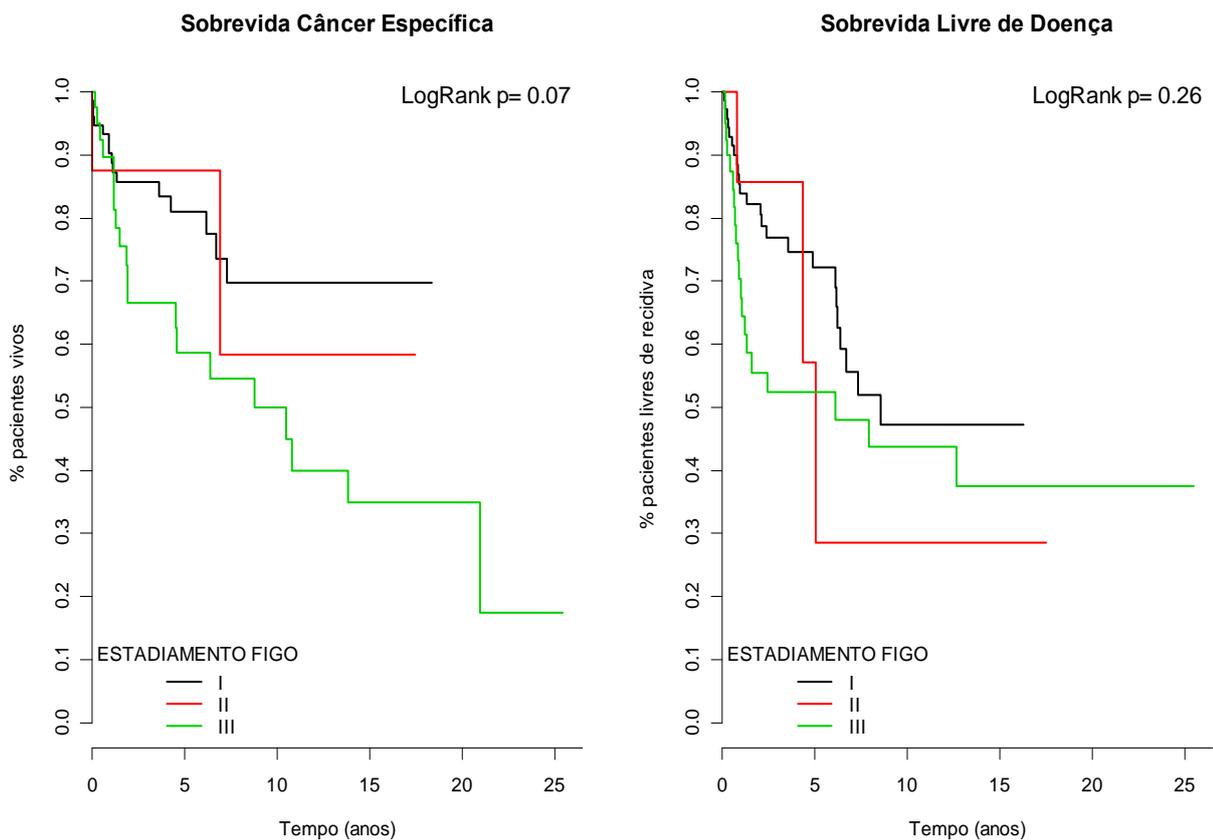


Figura 17 - Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação aos estadiamentos tumorais dentre as pacientes com carcinoma de vulva

Tabela 13 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Recorrência em 5 anos em relação ao estadiamento FIGO

Sobrevida em 5 anos	Estadiamento FIGO	SCE			SLD		
		n	RR	P	n	RR	p
Estadiamento FIGO	I	77	1		74	1	
	II	8	1.06	0.07	8	1.29	0.26
	III	42	2.15		41	1.65	

Legenda:

RR: Risco Relativo

Uma ampla gama de aspectos relacionados ao tratamento das pacientes, tais como tipos de cirurgias realizadas, tratamento adjuvante e linfadenectomia, foi avaliada, bem como as complicações decorrentes do tratamento e o desfecho clínico das pacientes (recorrência e *status*). Todos estes dados estão ilustrados nas **Tabelas 14 e 15**. Dentre as pacientes selecionadas no estudo que realizaram cirurgia de vulva no Hospital A.C.Camargo, a mais comumente realizada foi a vulvectomy radical tripla incisão (57,27%), seguido da hemivulvectomy (20%), vulvectomy radical clássica (12,72%) e ressecção local ampla (10%). Cerca de 20% das pacientes recebeu tratamento adjuvante: 14,38% receberam quimioterapia adjuvante e 5% radioterapia adjuvante.

Complicações ao tratamento foram presentes em 54,5% das mulheres, sendo a mais comum a deiscência da ferida (41,96%). Infecção foi presente em 21,42% e necrose do retalho em 17,85%. Seroma e linfedema foram menos comuns, acometendo 8,03% e 10,71%, respectivamente.

Recorrência foi observada em 38,58% dos casos, sendo as recorrências local e linfonodal as mais freqüentes (38,78% e 24,49% de

todos os tipos de recorrência observados, respectivamente). Dentre as mulheres que sofreram qualquer tipo de recidiva tumoral, 65,3% morreram de câncer. A curva de sobrevida global das pacientes em relação à presença ou não de recidiva tumoral está demonstrada na **Figura 18** e demonstrou pior sobrevida ($p < 0,0001$) das pacientes que sofreram qualquer tipo de recorrência (47%) quando comparadas àquelas que não sofreram nenhum tipo de recidiva (96%). Já em relação ao *status* global das pacientes, 41,30% estavam vivas sem câncer no momento da coleta dos dados de prontuário, 33,33% morreram da doença, 13,04% morreram de outras causas, 7,24% estavam vivas com a doença e 5,07% morreram de causas não especificadas.

Tabela 14 - Tipo de tratamento de escolha para as pacientes com carcinoma de células escamosas de vulva que realizaram tratamento cirúrgico no Hospital AC Camargo no período de 1979-2006. (São Paulo, Brasil).

<i>Tratamento</i>			
Tipo de Cirurgia		N	%
	Ressecção local ampla	11	10,0
	Vulvectomy parcial	22	20,0
	Vulvectomy radical clássica	14	12,72
	Vulvectomy radical “tripla incisão”	63	57,28
Tratamento adjuvante			
	Não	112	80,57
	Sim	27	19,42
	<i>Tipo de tratamento adjuvante</i>		
	Radioterapia adjuvante	20	14,38
	Quimioterapia adjuvante	7	5,03

Tabela 15 - Desfecho clínico das pacientes com carcinoma de células escamosas de vulva (São Paulo, Brasil).

<i>Desfecho clínico</i>			
Complicações		N	%
	Não	60	45,45
	Sim	72	54,54
	<i>Complicação</i>		
	Seroma	9	8,03
	Infecção da ferida	24	21,42
	Deiscência da ferida	47	41,96
	Necrose do retalho	20	17,85
	Linfedema	12	10,71
Recorrência			
	Não	78	61,41
	Sim	49	38,59
	<i>Tipo de recorrência</i>		
	Local	19	38,78
	Linfonodal	12	24,49
	Distância	5	10,20
	Locorregional + distância	10	20,41
	Ignorados	3	6,12
Status			
	Viva sem câncer	57	41,30
	Viva com câncer	10	7,24
	Morte por câncer	46	33,33
	Morte sem câncer	18	13,04
	Morte não especificada	7	5,07

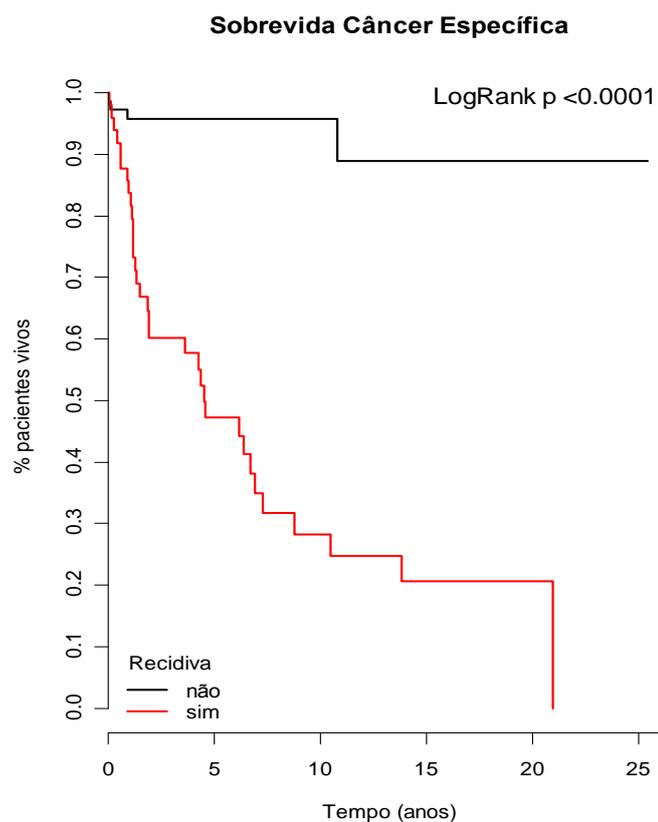


Figura 18 - Sobrevida global das pacientes em relação à recidiva do tumor

Tabela 16 – Sobrevida Câncer Específica em 5 anos em relação à recidiva do tumor

Sobrevida em 5 anos	SCE			
	Recidiva	n	RR	P
Recidiva	Não	77	1	<0.0001
	Sim	50	13.51	

Legenda:

RR: Risco Relativo

A curva de sobrevida câncer específica traçada para as nossas pacientes demonstrou que cerca de 70% estavam vivas em 5 anos, ao passo que a curva de sobrevida livre de doença demonstrou que cerca de

75% das mulheres não sofreram recidiva tumoral no espaço de tempo equivalente a 5 anos, como demonstradas na **Figura 19**.

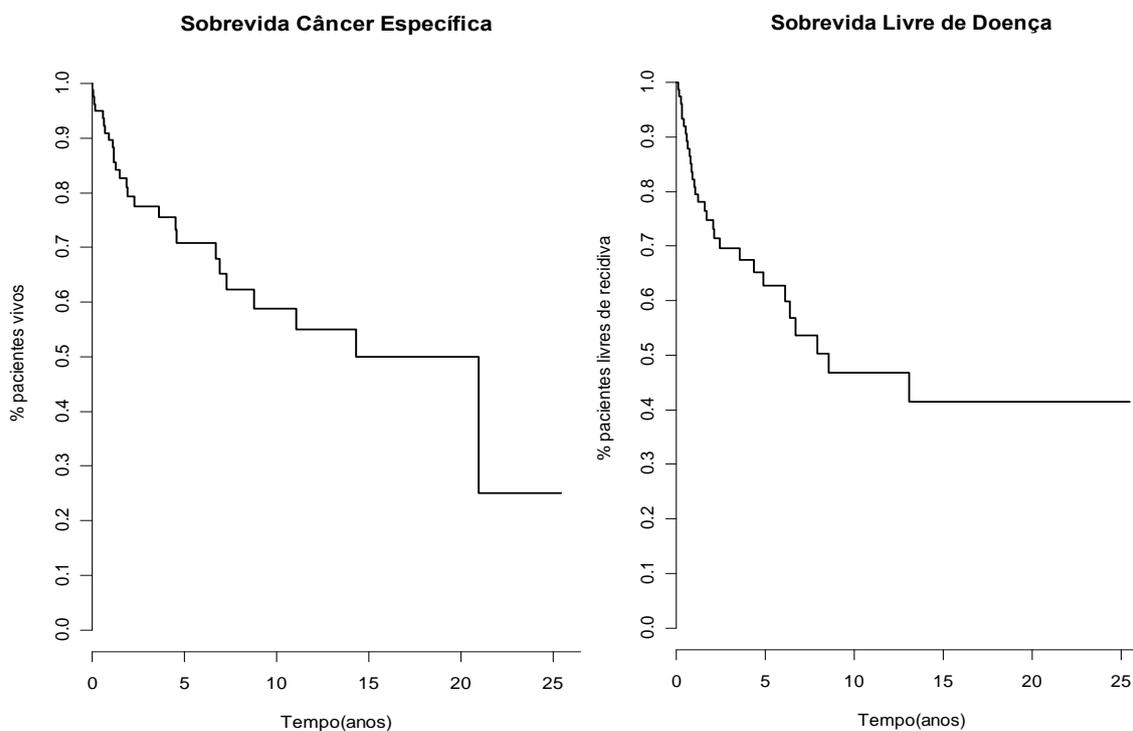


Figura 19 - Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença das pacientes com carcinoma de vulva

5.3 AVALIAÇÃO DE ONCOGENES EM CARCINOMAS DE VULVA

5.3.1 Imunoistoquímica

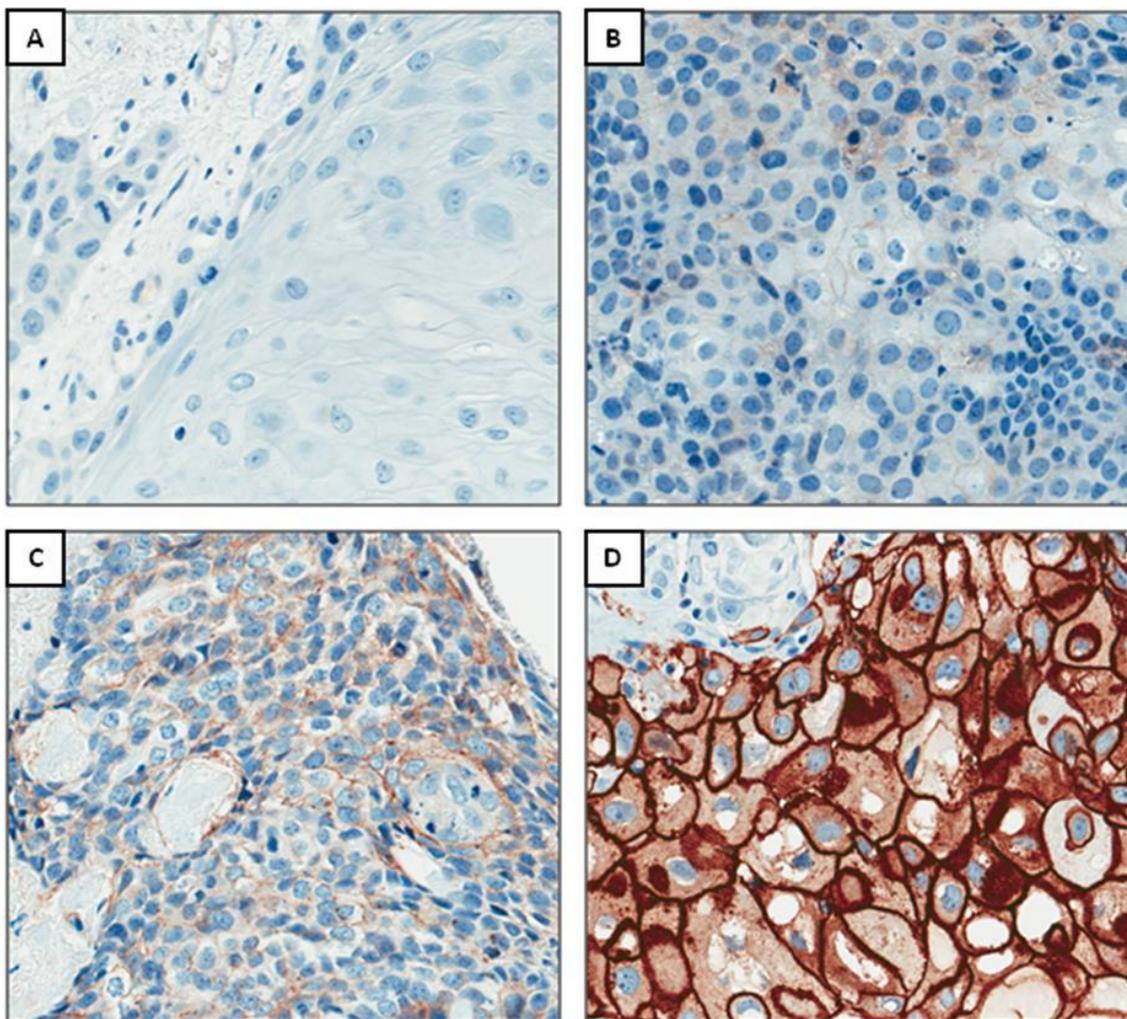
A HER-2

A avaliação do receptor HER-2 por imunoistoquímica (**Figura 20**) demonstrou ausência de marcação de membrana para a maior parte dos casos: 84,89% tiveram escore 0, sendo que somente 1,44% mostraram

escore 3+. Marcação citoplasmática foi positiva em 15,11% dos tumores avaliados. Alguns casos não puderam ser avaliados por perda do *spot* do TMA ou falta de área representativa de tumor (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Imunoexpressão de membrana e citoplasma para HER-2 em carcinomas de vulva

HER-2					
Marcação de membrana (escore)	n	%	Marcação citoplasmática	N	
				N	%
0	118	84,89	Negativa	104	74,82
1+	3	2,16			
2+	2	1,44			
3+	2	1,44			
<i>Não avaliáveis</i>	14	10,0	<i>Não avaliáveis</i>	14	10,07



Legenda: **A:** Imagem representativa de imunohistoquímica negativa (escore 0); **B:** Imunohistoquímica negativa (escore 1+); **C:** Imunohistoquímica fraco-positiva (escore 2+); **D:** Imunohistoquímica positiva (escore 3+).

Figura 20 - Ilustração da técnica de imunohistoquímica para a proteína HER-2 em carcinomas de vulva: avaliação de marcação de membrana (Aumento de 40x).

Visando analisar a relação entre os resultados obtidos na imunohistoquímica e dados histopatológicos e clínicos das pacientes, foram realizadas associações entre estes dados, que estão ilustrados na **Tabela 18**. Não foi possível a realização de tratamento estatístico nestes dados,

devido à existência de uma amostra tumoral reduzida nos grupos 1+, 2+ e 3+.

Em relação às características histológicas dos casos avaliados, a hiperexpressão de HER-2 correspondeu, na maior parte dos casos, a tumores pouco diferenciados (CEC 3 e carcinoma basalóide), enquanto que a maior parte dos tumores classificados com escores 0, 1 + e 2+ eram tumores bem diferenciados ou com diferenciação moderada. Em relação à profundidade de invasão, grande parte dos tumores escore 0 e 1+ infiltraram a derme profunda. No entanto, invasão vascular e perineural não foram comuns nestes tumores. Dentre os tumores 2+ e 3+, metade deles (n=1) mostrou invasão vascular. Em sessenta e três por cento dos casos de escore 0, não foram observadas lesões associadas ao tumor. Dentre os de escore 1+, 2+ e 3+, nenhum apresentou lesões associadas. Entende-se por lesões associadas a presença de carcinoma *in situ*, VINs (usuais ou diferenciadas), acantose vulvar e líquen escleroso. Recidiva não foi observada em grande parte dos tumores com escore 0, ao passo que dentre os dois tumores de escore 3+, um deles mostrou recidiva e em outro houve perda da informação no prontuário. Não foi possível a realização de curvas de sobrevida para este marcador na análise da membrana, uma vez que a quase totalidade dos casos foi negativa para HER-2. Já a avaliação da sobrevida das pacientes em relação à marcação de HER-2 no citoplasma, não houve significância entre a marcação positiva no citoplasma e sobrevidas câncer específica e livre de doença (**Figura 21**). A associação deste tipo de

marcação com a presença de metástases linfonodais está representada na

Tabela 20.

Tabela 18 - Imunoistoquímica para HER-2 em relação às características histopatológicas e dados clínicos das pacientes.

		HER-2				Total	P
Variáveis	Categoria	Escore na membrana					
		n (%)					
		0	1+	2+	3+		
	<i>CEC 1</i>	42 (36)	1 (33)	1 (50)	0	44	
	<i>CEC 2</i>	51 (43)	2 (66)	0	0	52	
	<i>CEC 3</i>	10 (8)	0	0	1 (50)	11	
	<i>Ca basalóide</i>	12 (10)	0	1 (50)	1 (50)	9	
	<i>Ca verrucoso</i>	2 (2)	0	0	0	2	
Diagnóstico	<i>Ca sarcomatóide</i>	1 (1)	0	0	0	1	N.A.
	<i>Derme superficial</i>	12 (10)	1 (33)	0	1 (50)	14	
	<i>Derme profunda</i>	92 (79)	2 (66)	1 (50)	1 (50)	96	
Profundidade da invasão	<i>Subcutâneo</i>	12 (10)	0	1 (50)	0	13	N.A.
	<i>Leve (1+)</i>	29 (25)	0	2 (100)	1 (50)	32	
	<i>Moderado (2+)</i>	73 (63)	2 (66)	0	1 (50)	76	
Infiltrado inflamatório	<i>Intenso (3+)</i>	13 (11)	1 (33)	0	0	14	N.A.
	<i>Não</i>	97 (87)	3 (100)	1 (50)	1 (50)	102	
Invasão Vascular	<i>Sim</i>	15 (13)	0	1 (50)	1 (50)	17	N.A.
	<i>Não</i>	99 (89)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	104	
Invasão Perineural	<i>Sim</i>	12 (11)	0	1 (50)	0	13	N.A.
	<i>Não</i>	41 (64)	2 (100)	0	0	43	
Metástase linfonodal	<i>Sim</i>	23 (36)	0	0	0	23	N.A.
	<i>Não</i>	73 (63)	3 (100)	2 (100)	2 (100)	80	
Lesões associadas	<i>Sim</i>	43 (37)	0	0	0	43	N.A.
	<i>IA</i>	1 (1)	0	0	0	1	
	<i>IB</i>	65 (56)	1 (33)	1 (50)	0	67	
	<i>II</i>	6 (6)	1 (33)	1 (50)	0	8	
	<i>IIIA</i>	7 (6)	1 (33)	0	0	8	
	<i>IIIB</i>	24 (21)	0	0	0	24	
	<i>IIIC</i>	7 (6)	0	0	0	7	
Estadiamento FIGO	<i>IVA</i>	1 (1)	0	0	0	1	N.A.

Legenda:

N.A.: Valor de p não avaliável

*: Perda do dado no prontuário

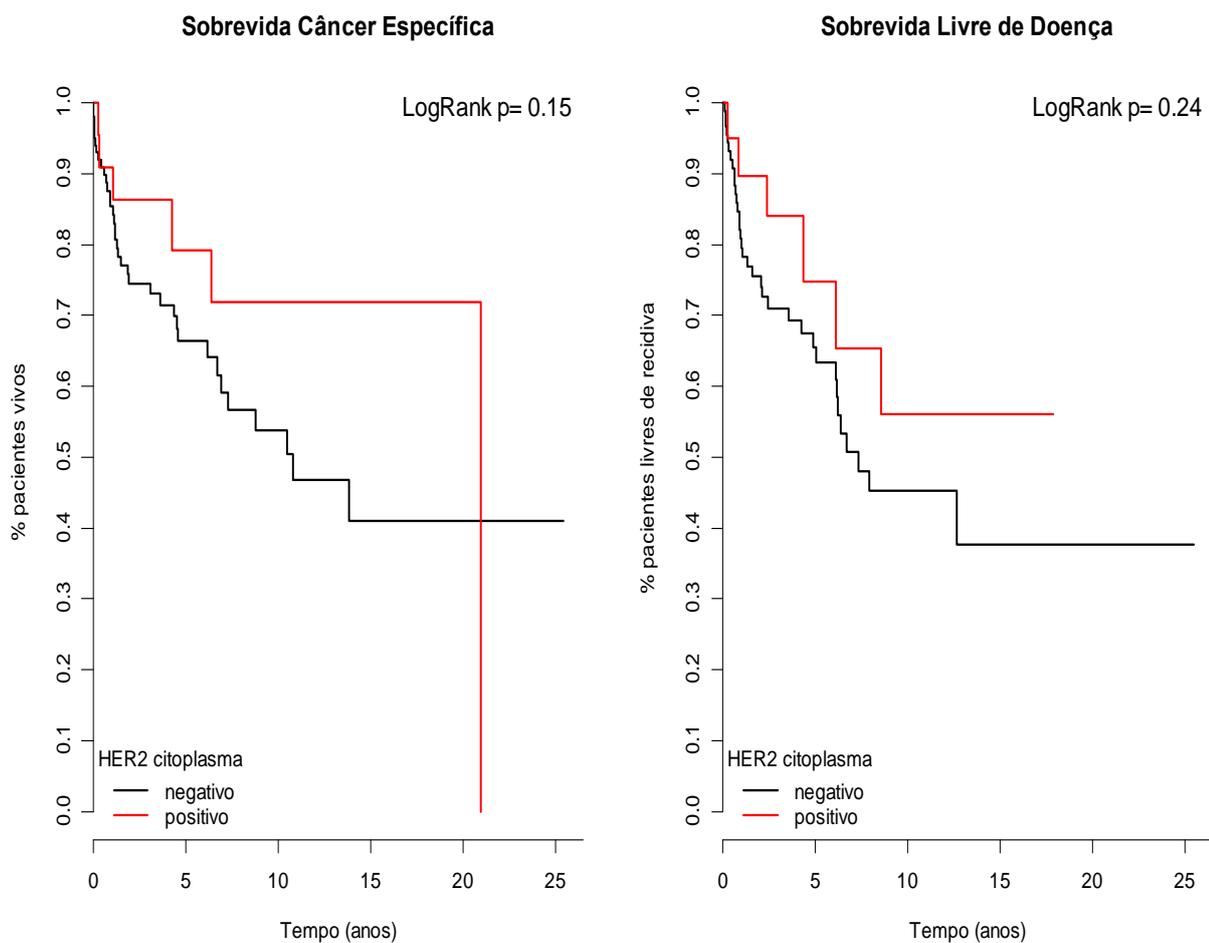


Figura 21 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador HER-2 no citoplasma.

Tabela 19 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador HER-2 no citoplasma

Marcador	Categoria	SCE			SLD		
		N	RR	P	n	RR	p
HER-2 citoplasma	Negativo	101	1.00	0.15	92	1.00	0.24
	Positivo	23	1.89		20	1.67	

Legenda:

RR: Risco Relativo

B EGFR

A avaliação dos níveis protéicos de EGFR na membrana por imunohistoquímica (**Figura 22**) demonstrou hiperexpressão deste receptor em um número pequeno de amostras, de modo semelhante ao obtido na análise de HER-2. Foi observado escore 0 em 57,55% dos casos, 1+ em 19,42%, 2+ em 10,07% e 3+ em 3,60%, como demonstrado na **Tabela 20**.

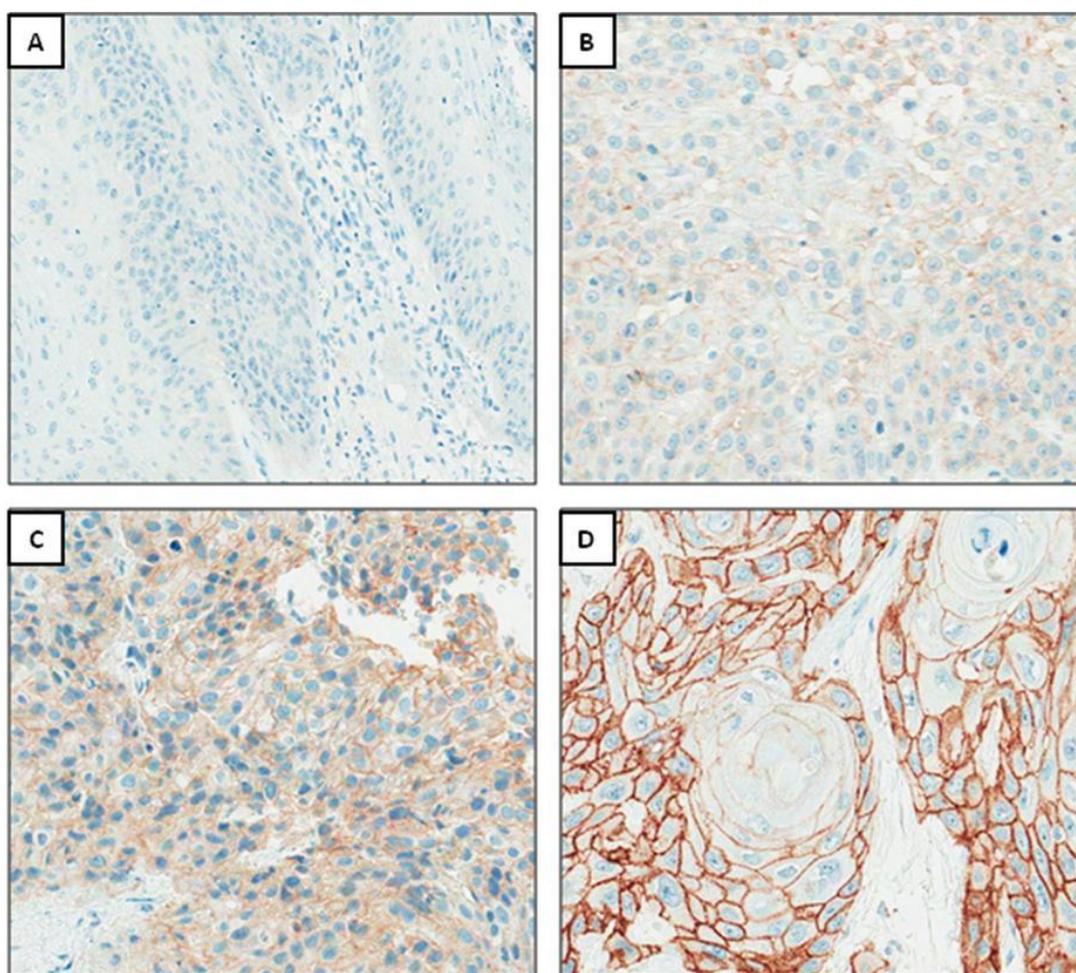
Tabela 20 - Imunoexpressão de membrana para EGFR em carcinomas de Vulva.

EGFR		
Marcação de membrana (escore)	N	%
0	80	57,55
1+	27	19,42
2+	14	10,07
3+	5	3,60
<i>Não avaliáveis</i>	13	9,35

As associações entre as análises imunohistoquímicas e principais características anatomo-patológicas dos tumores estão ilustradas na **Tabela 21**. Grande parte dos tumores, independentemente da marcação positiva ou negativa para EGFR, foram classificados como tumores de baixo grau (CEC1, carcinoma verrucoso ou CEC2), infiltraram a derme superficial ou a derme, apresentaram infiltrado inflamatório moderado (2+), não apresentaram invasão vascular, perineural, metástase linfonodal ou lesões associadas. Nenhuma das associações realizadas foi estatisticamente significativa. Já em relação ao estadiamento FIGO, grande parte dos tumores negativos para EGFR na membrana (escores 0 ou 1+) foram classificados

como FIGO I ou II (66%), enquanto a maior parte dos tumores EGFR positivos (escores 2+ ou 3+) foram FIGO III ou IV (56%), com nível de significância estatístico marginal, $p=0,08$.

Em relação às sobrevidas, tanto a sobrevida câncer específica quanto a livre de doença não foram estatisticamente significativas para este marcador (**Figura 23**). É importante ressaltar que, devido ao pequeno número de casos com escore 3+, a análise de sobrevidas contemplou apenas os escores 0, 1+ e 2+ (**Tabela 22**).



Legenda: **A:** Imunoistoquímica negativa (escore 0); **B:** Imunoistoquímica negativa (escore 1+); **C:** Imunoistoquímica escore 2+; **D:** Imunoistoquímica positiva (escore 3+)

Figura 22 - Imunoistoquímica de EGFR em carcinomas de vulva: avaliação de marcação de membrana (Aumento de 40x)

Tabela 21 - Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunohistoquímica para EGFR

EGFR					
Variáveis	Categoria	Marcação membrana		Total	p
		Negativa ^a	Positiva ^b		
		n (%)	n (%)		
Diagnóstico	<i>CEC 1 ou verrucoso</i>	37 (35)	7 (37)	44	0.99
	<i>CEC 2</i>	47 (44)	9 (47)	56	
	<i>CEC 3 ou basalóide</i>	23 (21)	3 (16)	20	
Profundidade da invasão	<i>Derme superficial ou derme</i>	64 (61)	12 (63)	76	0.86
	<i>Derme profunda ou subcutâneo</i>	41 (39)	7 (37)	48	
Infiltrado inflamatório	<i>Leve (1+)</i>	29 (28)	3 (16)	32	0.25
	<i>Moderado (2+)</i>	65 (63)	12 (63)	77	
	<i>Intenso (3+)</i>	10 (10)	4 (21)	14	
Invasão Vascular	<i>Não</i>	86 (85)	17 (89)	103	0.89
	<i>Sim</i>	15 (15)	2 (11)	17	
Invasão Perineural	<i>Não</i>	86 (87)	19 (100)	105	0.20
	<i>Sim</i>	13 (13)	0	13	
Metástase linfonodal	<i>Não</i>	36 (65)	8 (62)	44	0.95
	<i>Sim</i>	19 (35)	5 (38)	24	
Lesões Associadas	<i>Não</i>	71 (71)	13 (76)	84	0.86
	<i>Sim</i>	29 (29)	4 (24)	33	
Estadiamento FIGO	<i>I ou II</i>	69 (66)	8 (44)	77	0.08
	<i>III ou IV</i>	35 (34)	10 (56)	45	

Legenda:

a. Negativo: escores 0 e 1+ de membrana

b. Positivo: escores 2+, 3+

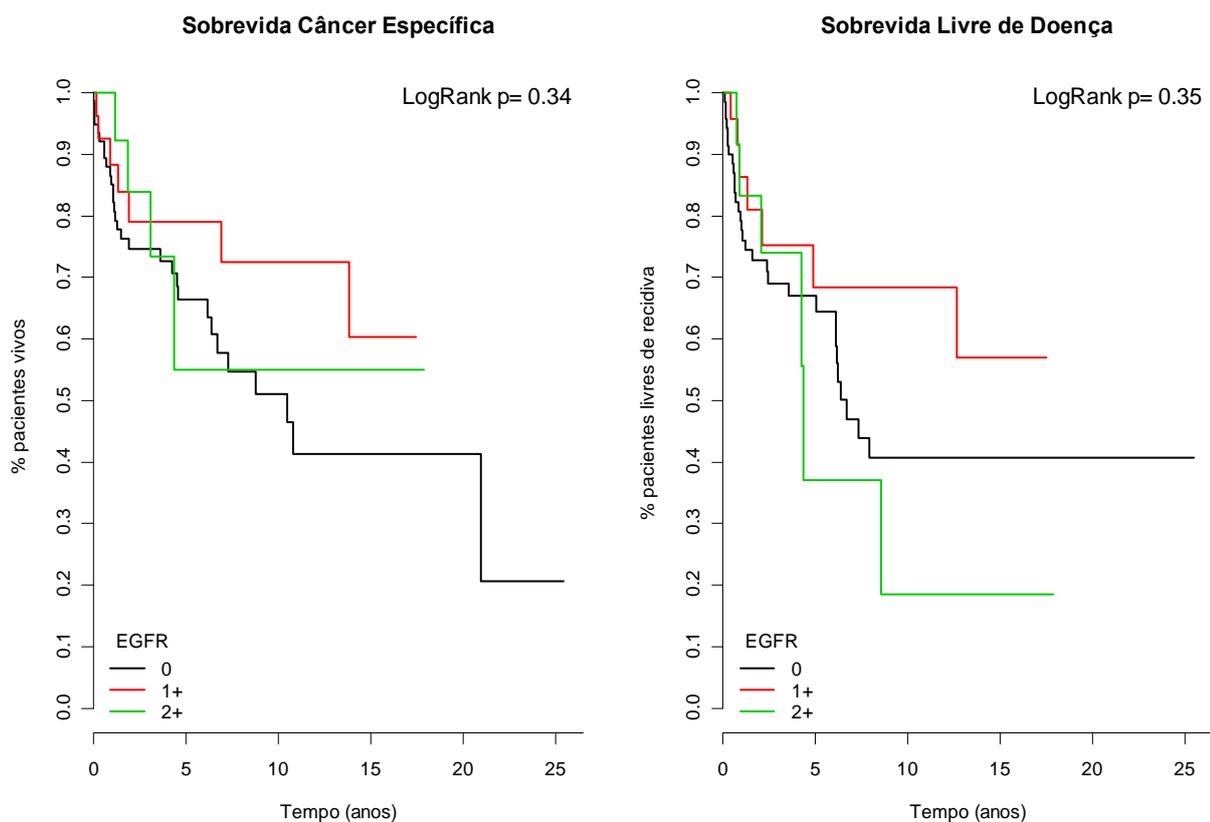


Figura 23 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador EGFR

Tabela 22 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador EGFR

Sobrevida em 5 anos	SCE				SLD		
	Escore	N	RR	p	n	RR	p
	0	79	1.00	0.34	72	1.00	0.35
	1	27	0.55		24	0.57	
EGFR	2	14	0.74		13	1.15	

Legenda:

RR: Risco Relativo

C c-KIT

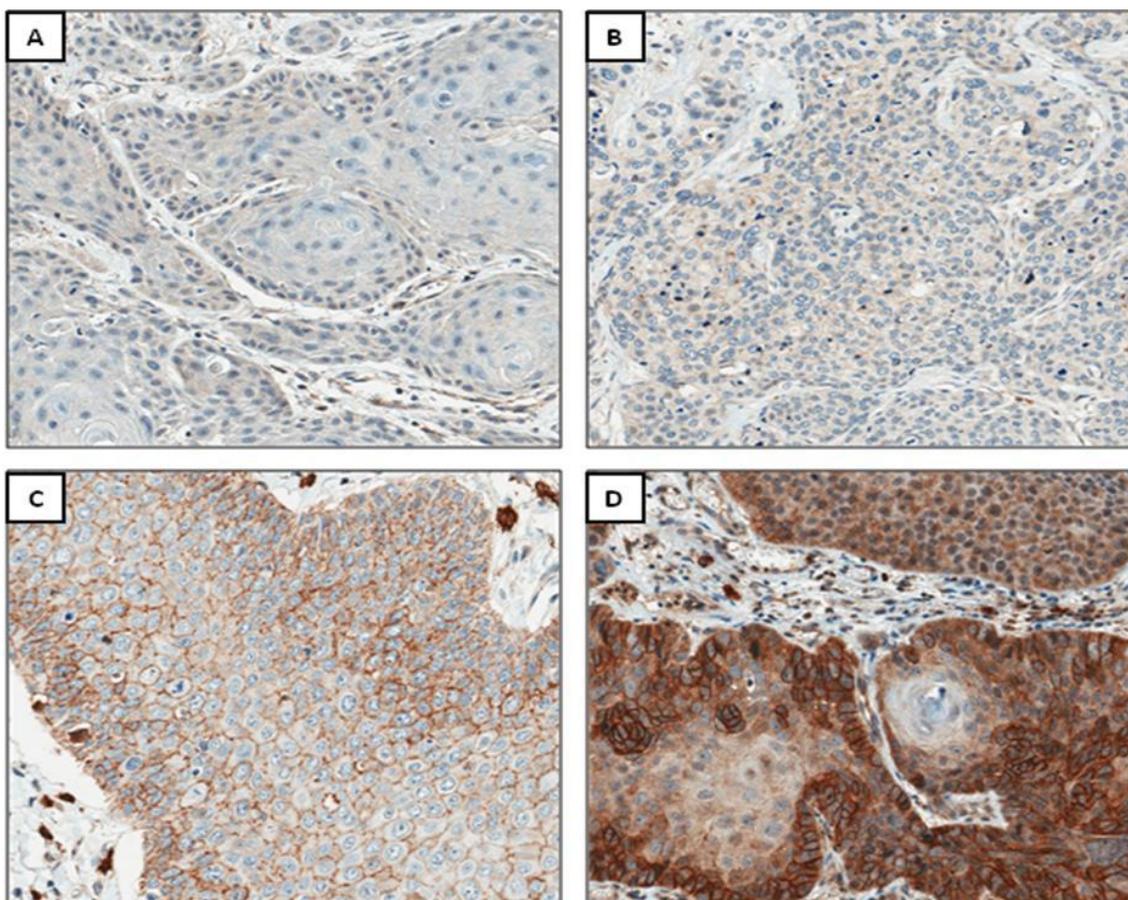
Positividade da proteína c-KIT foi observada através da imunohistoquímica na membrana das células e/ou no citoplasma em 70,5% dos casos (**Tabela 23**). A positividade e negatividade desta proteína estão ilustradas na **Figura 24** e as associações da expressão protéica e achados anatomo-patológicos dos tumores estão relacionados na **Tabela 24**.

Dentre as associações da expressão protéica de c-KIT e as variáveis histopatológicas e dados clínicos das pacientes, não foram observados resultados estatisticamente significantes. De modo independente da marcação positiva ou negativa do tumor, a maior parte dos casos foi classificada como CEC2, com invasão da derme superficial ou derme intermediária, inflamatório moderado e ausência de invasão vascular ou perineural. Com nível de significância marginal ($p=0,09$), 68% dos tumores c-KIT (+) não apresentaram nenhum tipo de lesão associada ao tumor (carcinoma *in situ*, VINs, acantose vulvar ou líquen escleroso).

Ainda que não tenha havido grau de significância estatisticamente significativo ($p=0,08$), foi observada tendência de melhor sobrevida câncer específica em 5 anos para as pacientes cujos tumores expressavam c-KIT (sobrevida de 71%), comparado com aquelas com expressão negativa do receptor (sobrevida de 48%) (**Figura 25**).

Tabela 23 - Imunoexpressão da proteína c-KIT em carcinomas de vulva

c-KIT		
Marcação de membrana e/ou citoplasma	n	%
Negativa	34	24,46
Positiva	98	70,50
<i>Não avaliáveis</i>	7	5,04



Legenda: **A e B:** Imunoistoquímica negativa para c-KIT; **C:** Imunoistoquímica positiva para c-KIT na membrana e **D:** imunoistoquímica positiva na membrana e citoplasma.

Figura 24 - Imunoistoquímica para c-KIT em carcinomas de vulva: avaliação de imunorreatividade na membrana e/ou citoplasma (Aumento de 40x).

Tabela 24 - Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunistoquímica para c-KIT

		c-KIT		Total	p
Variáveis	Categoria	Marcação			
		Negativo ^a	Positivo ^b		
		n (%)	n (%)		
Diagnóstico	<i>CEC 1 ou verrucoso</i>	12 (36)	34 (37)	46	0.68
	<i>CEC 2</i>	17 (52)	42 (45)	59	
	<i>CEC 3 ou basalóide</i>	4 (12)	17 (18)	21	
Profundidade da invasão	<i>Derme superficial ou derme</i>	20 (61)	59 (61)	79	0.98
	<i>Derme profunda ou subcutâneo</i>	13 (39)	38 (39)	51	
Infiltrado inflamatório	<i>Leve (1+)</i>	13 (39)	23 (24)	36	0.10
	<i>Moderado (2+)</i>	19 (58)	60 (63)	79	
	<i>Intenso (3+)</i>	1 (3)	13 (14)	14	
Invasão Vascular	<i>Não</i>	28 (82)	80 (87)	108	0.71
	<i>Sim</i>	6 (18)	12 (13)	18	
Invasão Perineural	<i>Não</i>	29 (85)	82 (91)	111	0.54
	<i>Sim</i>	5 (15)	8 (9)	13	
Metástase linfonodal	<i>Não</i>	9 (47)	35 (69)	44	0.10
	<i>Sim</i>	10 (53)	16 (31)	26	
Lesões Associadas	<i>Não</i>	26 (84)	62 (68)	88	0.09
	<i>Sim</i>	5 (16)	29 (32)	34	
Estadiamento FIGO	<i>I ou II</i>	19 (59)	61 (64)	80	0.62
	<i>III ou IV</i>	13 (41)	34 (36)	47	

Legenda:

a. Negativo: ausência de marcação

b. Positivo: marcação de membrana e/ou citoplasma

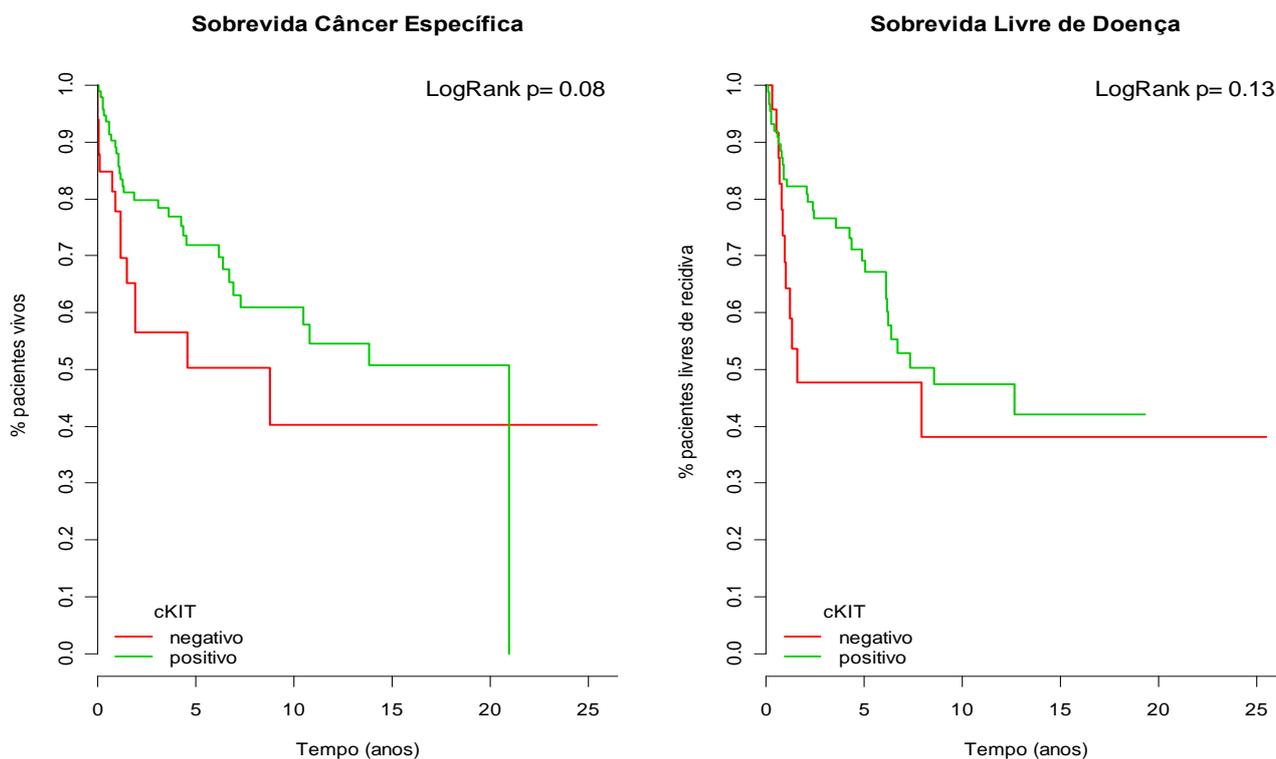


Figura 25 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador c-KIT

Tabela 25 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador c-KIT

Sobrevida em 5 anos	Escore	n	SCE		SLD		
			RR	P	n	RR	P
c-KIT em 5 anos	Negativo	34	1.00	0.08	28	1.00	0.13
	Positivo	97	0.57		90	0.60	

Legenda:

RR: Risco Relativo

D c-MYC

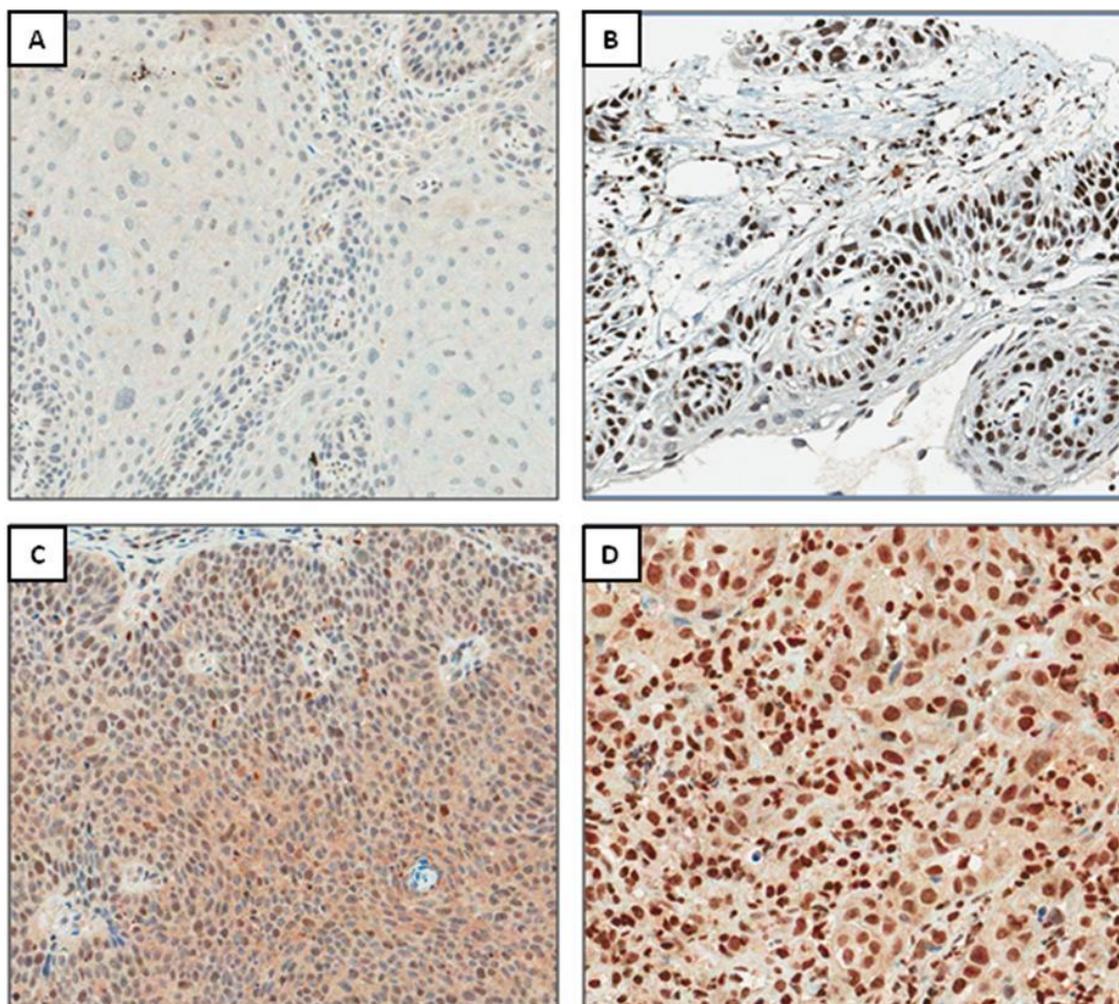
Positividade da proteína c-MYC no citoplasma foi observada em mais da metade das amostras, o equivalente a 59,71% e em 18,71% no núcleo (**Tabela 26**). Oito casos demonstraram marcação exclusivamente nuclear. A positividade e negatividade desta proteína nos diferentes compartimentos celulares estão ilustradas na **Figura 26**.

Tabela 26 - Imunoexpressão da proteína c-MYC em carcinomas de vulva.

Marcação	c-MYC			
	Citoplasma		Núcleo	
	n	%	N	%
Positivo	83	59,71	26	18,71
Negativo	45	32,37	102	73,38
Não avaliáveis	11	7,91	11	7,91

A imunoexpressão citoplasmática desta proteína em relação às características histopatológicas e clínicas demonstrou, na maioria dos casos, tanto para tumores positivos quanto negativos para c-MYC, infiltrado inflamatório moderado (2+) e ausência de invasão vascular, perineural, metástases ou lesões associadas (presença de carcinoma *in situ*, VINs (usuais ou diferenciadas), acantose vulvar e líquen escleroso) - **Tabela 27**. Um resultado estatisticamente significativo foi observado em relação à profundidade de invasão, no qual 75% dos tumores negativos para c-MYC infiltraram a derme superficial ou intermediária, ao passo que, dentre os 51 casos em que observou-se infiltração da derme profunda, 42 eram positivos para c-MYC (p=0,03).

As expressões citoplasmática e nuclear de c-MYC foram correlacionadas com a sobrevida das pacientes e estão dispostas nas **Figuras 27-28** e **Tabelas 28-29**, não mostrando resultados estatisticamente significantes.



Legenda: **A:** Imunoistoquímica negativa para c-MYC; **B:** Imunoistoquímica positiva para a marcação nuclear de c-MYC; **C:** Imunoistoquímica positiva para c-MYC no citoplasma; **D:** Imunoistoquímica positiva para c-MYC no citoplasma, acompanhada de marcação nuclear.

Figura 26 - Imunoistoquímica para c-MYC nuclear e citoplasmático em carcinomas de vulva (Aumento de 40x).

Tabela 27 - Imunoistoquímica para c-MYC no citoplasma em relação às características histopatológicas e dados clínicos das pacientes

		c-MYC		Total	P
Variáveis	Categoria	Marcação			
		Negativo ^a n (%)	Positivo ^b n (%)		
Diagnóstico	<i>CEC 1/ Carcinoma verrucoso</i>	14 (39)	32 (36)	46	0.494
	<i>CEC 2</i>	13 (36)	42 (47)	55	
	<i>CEC 3/Carcinoma basalóide</i>	9 (25)	16 (18)	25	
Profundidade da invasão	<i>Derme superficial ou derme</i>	27 (75)	48 (53)	75	0.03
	<i>Derme profunda ou subcutâneo</i>	9 (25)	42 (47)	51	
	<i>Leve (1+)</i>	12 (34)	20 (22)	32	
Infiltrado inflamatório	<i>Moderado (2+)</i>	22 (63)	57 (63)	79	0.11
	<i>Intenso (3+)</i>	1 (3)	13 (14)	14	
	<i>Não</i>	32 (91)	72 (83)	104	
Invasão Vascular	<i>Sim</i>	3 (9)	15 (17)	18	0.35
	<i>Não</i>	32 (91)	75 (88)	107	
Invasão Perineural	<i>Sim</i>	3 (9)	10 (12)	13	0.85
	<i>Não</i>	15 (68)	29 (63)	44	
Metástase linfonodal	<i>Sim</i>	7 (32)	17 (37)	24	0.68
	<i>Não</i>	23 (66)	61 (73)	84	
Lesões Associadas	<i>Sim</i>	12 (34)	22 (27)	34	0.53
	<i>I ou II</i>	25 (74)	52 (63)	77	
Estadiamento FIGO	<i>III ou IV</i>	9 (26)	31 (37)	40	0.26

Legenda:

a. Negativo: Ausência de marcação

b. Positivo: Marcação citoplasmática e/ou nuclear

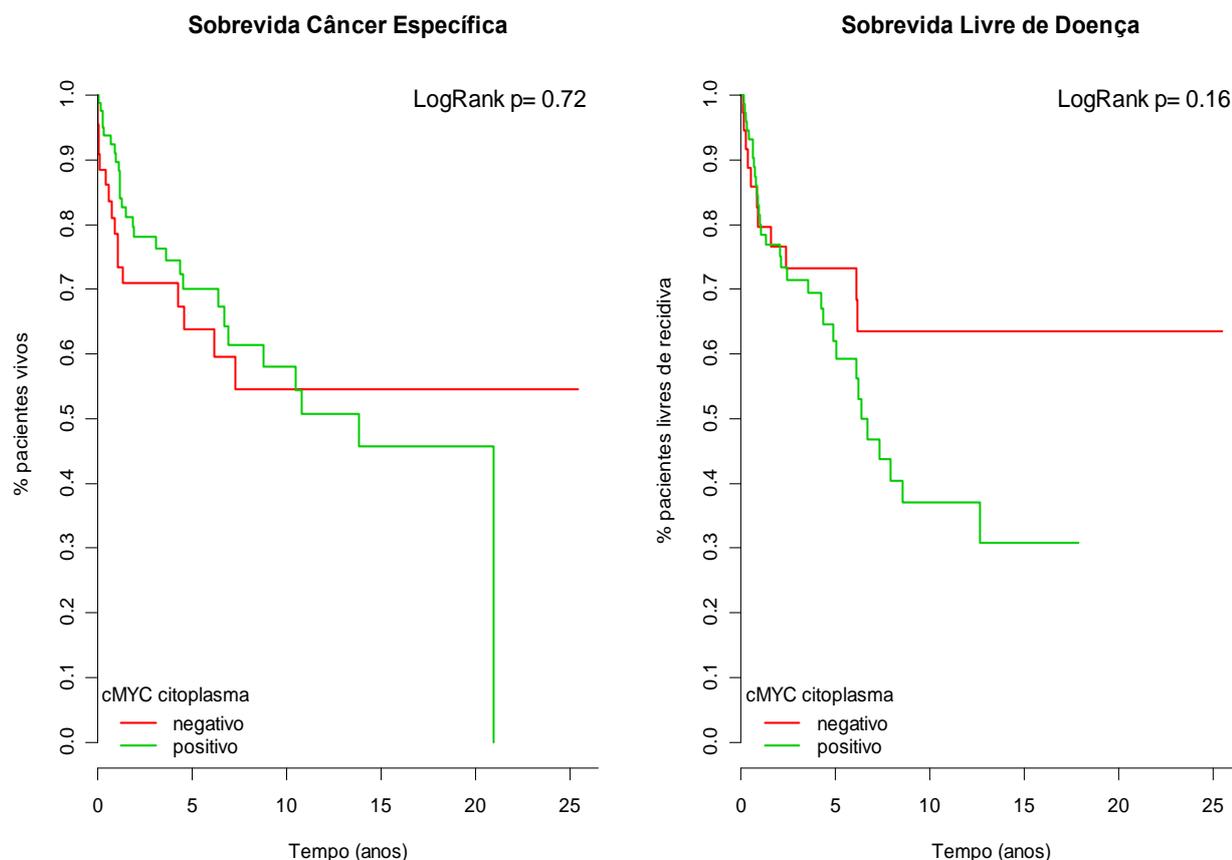


Figura 27 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador c-MYC com marcação citoplasmática

Tabela 28 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador c-MYC no citoplasma.

Sobrevida em 5 anos	c-MYC citoplasma	SCE			SLD		
		N	RR	P	N	RR	p
Sobrevida em 5 anos	Negativo	45	1.00	0.72	40	1.00	0.16
c-MYC citoplasma	Positivo	82	0.89		74	1.63	

Legenda:

RR: Risco Relativo

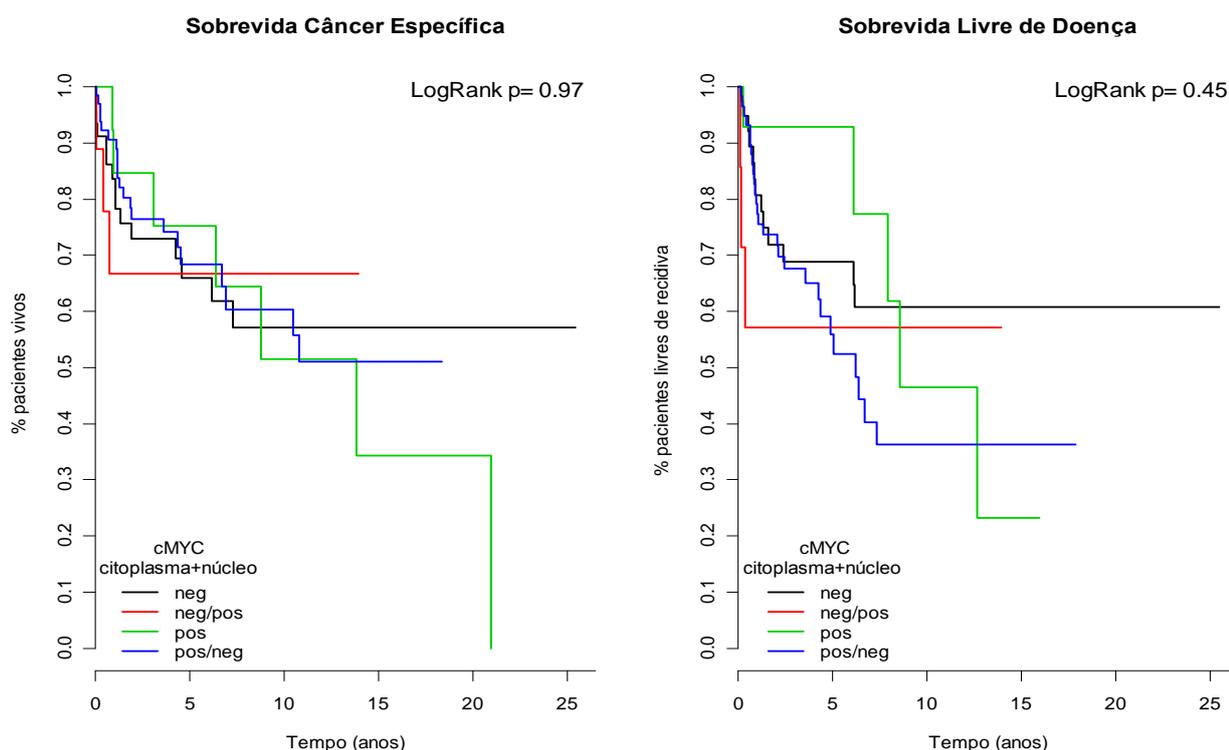


Figura 28 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador c-MYC com marcação citoplasmática e/ou nuclear

Tabela 29 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador c-MYC no citoplasma e na relação expressão citoplasma/expressão núcleo

Sobrevida em 5 anos	c-MYC citoplasma/núcleo	SCE			SLD		
		n	RR	P	n	RR	p
Sobrevida em 5 anos	Negativo C/N	47	1.00		44	1.00	
c-MYC cito/núcleo	Negativo C/positivo N	9	1.17	0.97	7	2.02	0.45
	Positivo N e C	17	1.09		15	1.07	
	Positivo C/negativo N	65	0.94		58	1.59	

Legenda:

RR: Risco Relativo

E n-MYC

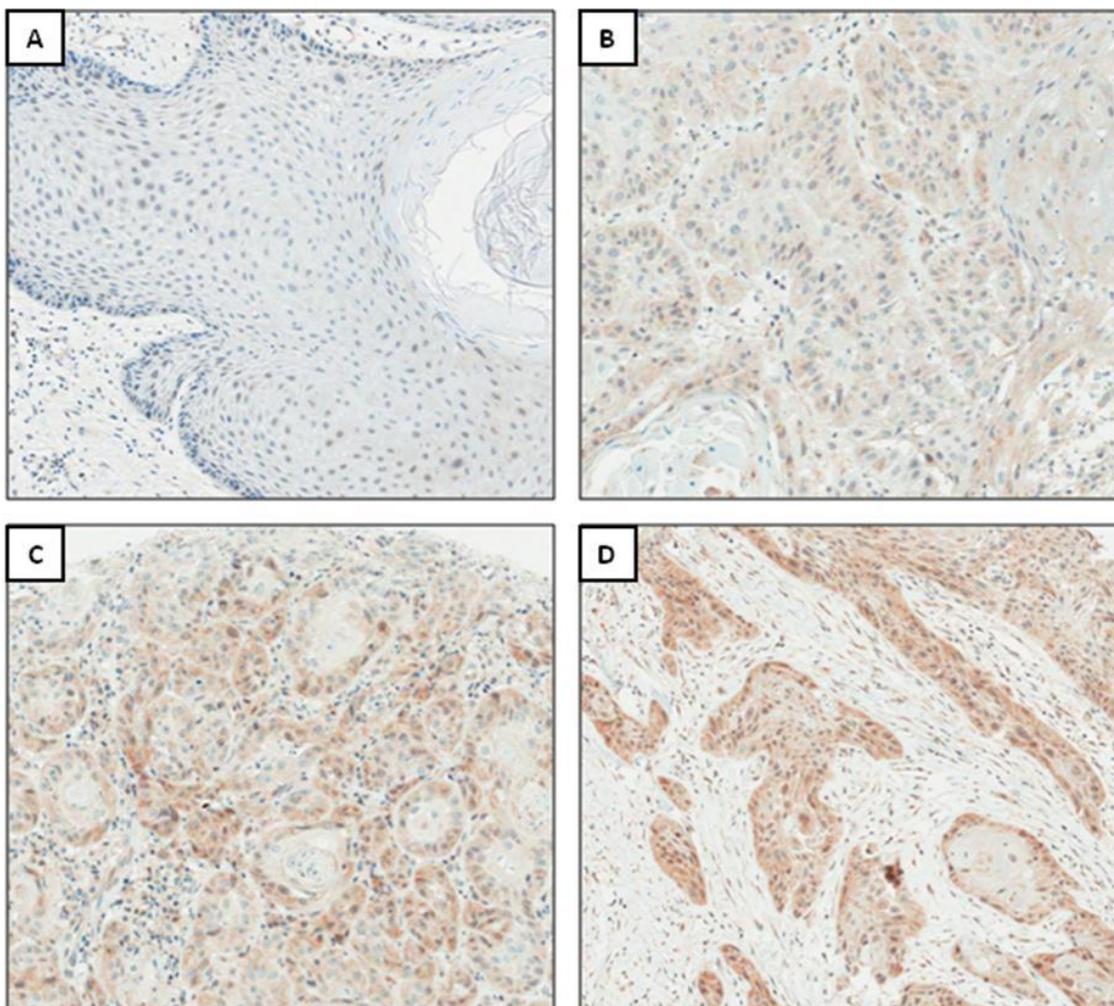
A análise imunoistoquímica para a proteína n-MYC no citoplasma demonstrou uma grande maioria das amostras pertencentes aos escores 0 e 1+, (30,22% e 40,29%, respectivamente), como demonstrado na **Tabela 30**. Os diferentes escores de marcação citoplasmática obtidos estão ilustrados na **Figura 29**.

A avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunoistoquímica para qualquer marcação de n-MYC (escores 1+,2+ e 3+), de modo semelhante a outros marcadores analisados, não foi estatisticamente significativa. A infiltração da derme superficial ou derme, presença de infiltrado inflamatório moderado (2+), ausência de invasão vascular, perineural, metástase linfonodal ou doenças associadas, além da classificação em estadiamentos FIGO I ou II, foram comuns a mais da metade dos tumores (**Tabela 31**).

As sobrevidas câncer específica e livre de recorrência para este marcador estão ilustradas na **Figura 30** e **Tabela 32**.

Tabela 30 - Imunoexpressão da proteína n-MYC em carcinomas de vulva.

n-MYC		
Escore de marcação no citoplasma	N	%
0	42	30,22
1+	56	40,29
2+	20	14,39
3+	6	4,32
<i>Não avaliáveis</i>	15	10,79



Legenda: **A:** Imunoistoquímica escore 0; **B:** Imunoistoquímica escore 1+; **C:** Imunoistoquímica escore 2+; **D:** Imunoistoquímica escore 3+

Figura 29 - Imunoistoquímica para n-MYC considerando a marcação citoplasmática da proteína em carcinomas de vulva (Aumento de 40x).

Tabela 31 - Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunistoquímica para n-MYC

Variáveis	Categoria	n-MYC		Total	p
		Marcação			
		Negativo ^a n (%)	Positivo ^b n (%)		
Diagnóstico	<i>CEC 1/ Carcinoma verrucoso</i>	15 (36)	28 (35)	43	
	<i>CEC 2</i>	15 (36)	39 (49)	54	
	<i>CEC 3/Carcinoma basalóide</i>	12 (29)	13 (16)	25	0.21
Profundidade da invasão	<i>Derme superficial ou derme</i>	24 (57)	51 (64)	75	
	<i>Derme profunda ou subcutâneo</i>	18 (43)	29 (36)	47	0.48
	<i>Leve (1+)</i>	15 (36)	17 (22)	32	
Infiltrado inflamatório	<i>Moderado (2+)</i>	24 (57)	51 (65)	75	
	<i>Intenso (3+)</i>	3 (7)	11 (14)	14	0.18
	<i>Não</i>	33 (83)	69 (88)	102	
Invasão Vascular	<i>Sim</i>	7 (18)	9 (12)	16	0.37
	<i>Não</i>	34 (87)	70 (91)	104	
Invasão Perineural	<i>Sim</i>	5 (13)	7 (9)	12	0.76
	<i>Não</i>	18 (69)	28 (65)	46	
Metástase linfonodal	<i>Sim</i>	8 (31)	15 (35)	23	0.73
	<i>Não</i>	24 (63)	59 (76)	83	
Lesões Associadas	<i>Sim</i>	14 (37)	19 (24)	33	0.16
	<i>I ou II</i>	28 (70)	48 (60)	76	
Estadiamento FIGO	<i>III ou IV</i>	12 (30)	32 (40)	44	0.28

Legenda:

a. Negativo: Ausência de marcação

b. Positivo: Qualquer marcação no citoplasma

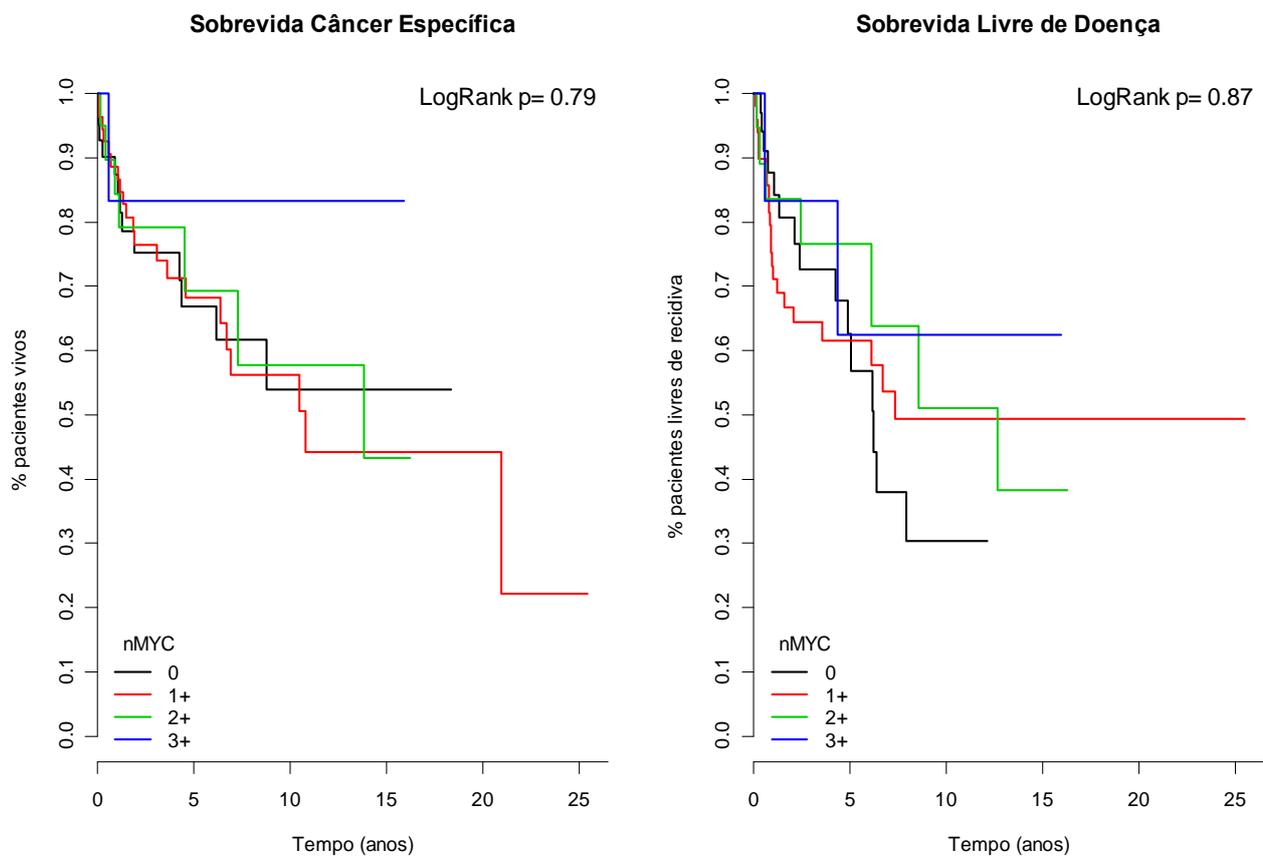


Figura 30 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador n-MYC

Tabela 32 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador n-MYC

Sobrevida em 5 anos	Escore	n	SCE		SLD		p
			RR	P	N	RR	
n-MYC em 5 anos	0	42	1.00		38	1.00	0.87
	1+	55	1.05	0.79	50	0.90	
	2+	20	0.99		19	0.75	
	3+	6	0.38		6	0.61	

Legenda:

RR: Risco Relativo

F NDRG-1

A reação imunoistoquímica de NDRG-1 mostrou marcação forte 3+ no citoplasma e/ou membrana em 60,43% dos casos e escore 2+ em 20,86% dos casos. Apenas um caso mostrou marcação escore 0 e dois casos 1+. Os diferentes escores estão ilustrados na **Figura 31**. Marcação nuclear, homogênea ou heterogênea, foi presente em 53,96% das amostras (**Tabela 33**), sendo que a maior parte das amostras com escores de citoplasma/membrana 2+ ou 3+ tiveram marcação nuclear heterogênea (**Tabela 34**).

Tabela 33 - Imunoexpressão da proteína NDRG-1 em carcinomas de vulva.

NDRG-1					
	Citoplasma/Membrana			Núcleo	
	n	%		N	%
0	1	0,72	Negativo	41	29,50
1+	2	1,44			
2+	29	20,86	Positivo	75	53,96
3+	84	60,43			
Não avaliável	23	16,55		23	16,55

Tabela 34 - Imunoexpressão da proteína NDRG-1 no citoplasma vs núcleo

NDRG-1 citoplasma/membrana	Expressão NDRG-1 citoplasma/membrana vs núcleo			Total
	NDRG-1 núcleo			
	n (%)			
	N(-)	N(+)	N(+)(-)	
0	1(100)	0	0	1
1+	1(50)	0	1(50)	2
2+	12(41)	2(7)	15(52)	29
3+	27(32)	5(6)	52(62)	84
Total	41(35)	7(6)	68(59)	116

Legenda:

N(-): Ausência de marcação nuclear

N(+): Marcação nuclear homogênea na amostra

N(+)(-): Marcação nuclear heterogênea na amostra

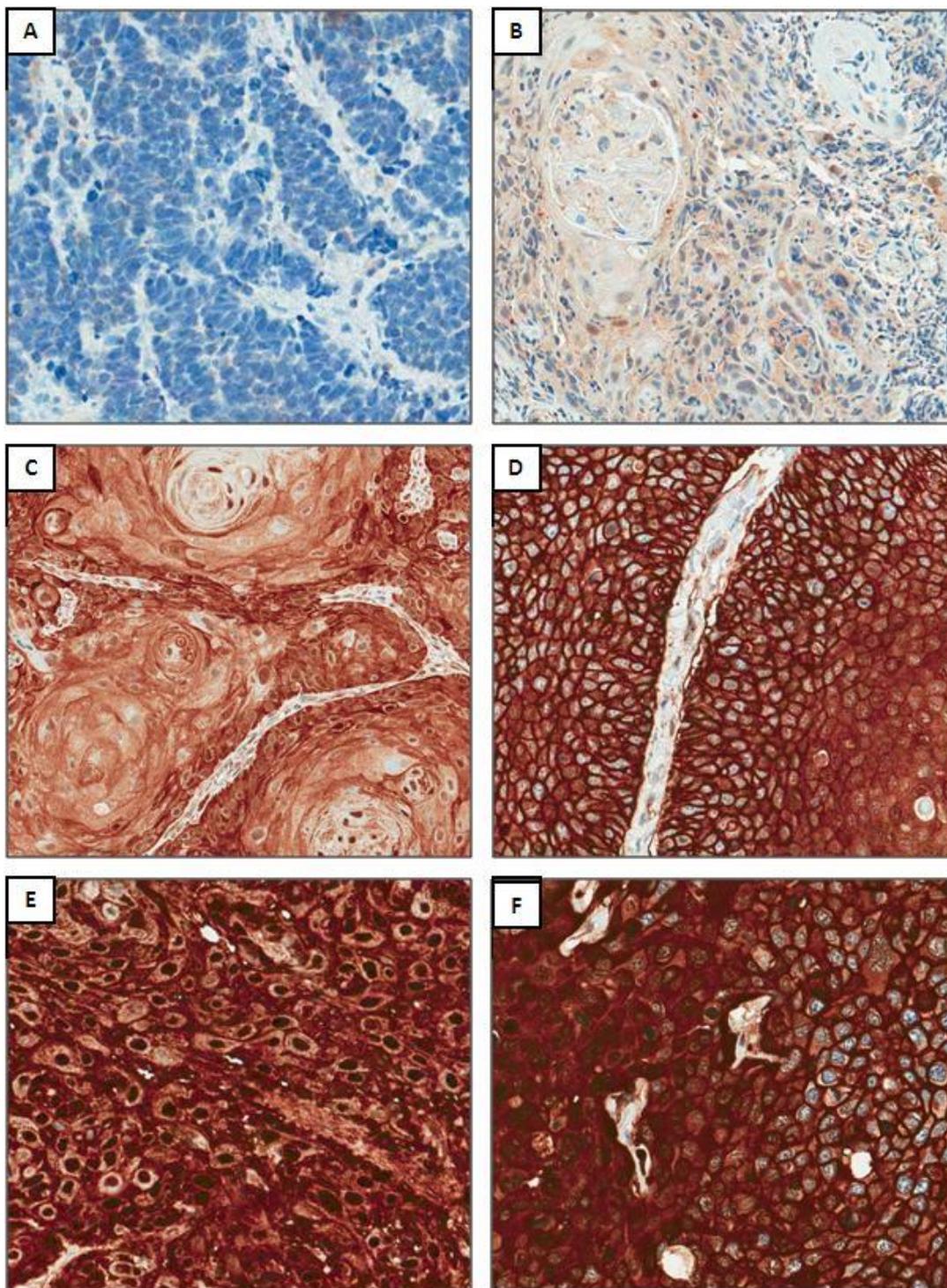
Em relação às características histopatológicas e dados clínicos, quando relacionadas com a expressão de NDRG-1, mostraram um agrupamento da maioria das características no grupo das amostras 3+, visto que foi o grupo que mais representou a casuística quanto a este marcador. Por este motivo, não foi possível a obtenção de um valor de p para este marcador em relação às características avaliadas. Entretanto, em uma análise descritiva, dentre as variáveis levantadas e descritas na **Tabela 35**, as que mais chamam a atenção são: dentre os 15 casos que apresentaram invasão vascular, 13 eram score 3+ para NDRG-1. Já entre os casos com invasão perineural, todos eram NDRG-1 3+, representando 15% dos tumores com este score. Dentre os estadiamentos clínicos mais avançados, observou-se que a maior parte dos tumores tinha expressão 3+ de NDRG-1. As curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença para NDRG-1 citoplasmático e nuclear estão nas **Figuras 32 e 33**, respectivamente, não demonstrando significância estatística.

Tabela 35 - Avaliação das características histopatológicas e dados clínicos das pacientes em relação à imunohistoquímica para o marcador NDRG-1 no citoplasma/membrana

NDRG-1 (citoplasma/membrana)							p
Variáveis	Categoria	NDRG1				Total	
		n(%)					
		0	1+	2+	3+		
	<i>CEC 1</i>	0	0	10 (37)	28 (36)	38	N.A.
	<i>CEC 2</i>	0	2 (100)	10 (37)	36 (46)	48	
	<i>CEC 3</i>	1 (100)	0	2 (7)	8 (10)	11	
	<i>Ca basalóide</i>	0	0	4 (15)	4 (5)	8	
	<i>Ca verrucoso</i>	0	0	0	2 (3)	2	
Diagnóstico	<i>Ca sarcomatóide</i>	0	0	1 (4)	0	1	
	<i>Derme superficial</i>	0	0	4 (15)	11 (13)	15	
	<i>Derme profunda</i>	1 (100)	2 (100)	21 (78)	61 (73)	85	
Profundidade da invasão	<i>Subcutâneo</i>	0	0	2 (7)	11 (13)	13	N.A.
	<i>Leve (1+)</i>	1 (100)	0	6 (22)	22 (22)	29	
	<i>Moderado (2+)</i>	0	1 (50)	18 (67)	51 (67)	70	
Infiltrado inflamatório	<i>Intenso (3+)</i>	0	1 (50)	3 (11)	9 (11)	13	N.A.
	<i>Não</i>	0	2 (100)	27 (96)	65 (83)	94	
Invasão Vascular	<i>Sim</i>	1 (100)	0	1 (4)	13 (17)	15	N.A.
	<i>Não</i>	1 (1)	1 (100)	27 (100)	66 (85)	95	
Invasão Perineural	<i>Sim</i>	0	0	0	12 (15)	12	N.A.
	<i>Não</i>	0	2 (100)	10 (62)	30 (67)	42	
Metástase linfonodal	<i>Sim</i>	1 (100)	0	6 (38)	15 (33)	22	N.A.
	<i>Não</i>	1 (100)	1 (50)	19 (66)	52 (62)	73	
Lesões Associadas	<i>Sim</i>	0	1 (50)	10 (34)	32 (38)	43	N.A.
	<i>IA</i>	0	0	0	1 (1)	1	
	<i>IB</i>	0	2 (100)	15 (58)	45 (56)	62	
	<i>II</i>	0	0	1 (4)	6 (8)	7	
	<i>IIIA</i>	0	0	2 (8)	6 (8)	8	
	<i>IIIB</i>	0	0	8 (31)	14 (18)	22	
	<i>IIIC</i>	1 (100)	0	0	7 (9)	8	
Estadiamento FIGO	<i>IVA</i>	0	0	0	1 (1)	1	N.A.

Legenda:

N.A.: Valor de p não avaliável



Legenda: **A:** Imunoistoquímica escore 0; **B:** Imunoistoquímica escore 1+; **C:** escore 2+; **D:** escore 3+ com marcação homogênea de membrana e citoplasma à esquerda e apenas citoplasmática à direita, sem marcação nuclear; **E:** Imunoistoquímica escore 3+ citoplasmática com marcação nuclear homogênea; **F:** Imunoistoquímica escore 3+ com marcação heterogênea de núcleo (positividade nuclear à esquerda e núcleos negativos, azuis, à direita).

Figura 31 - Imunoistoquímica para NDRG1 em carcinomas de vulva (Aumento de 40x).

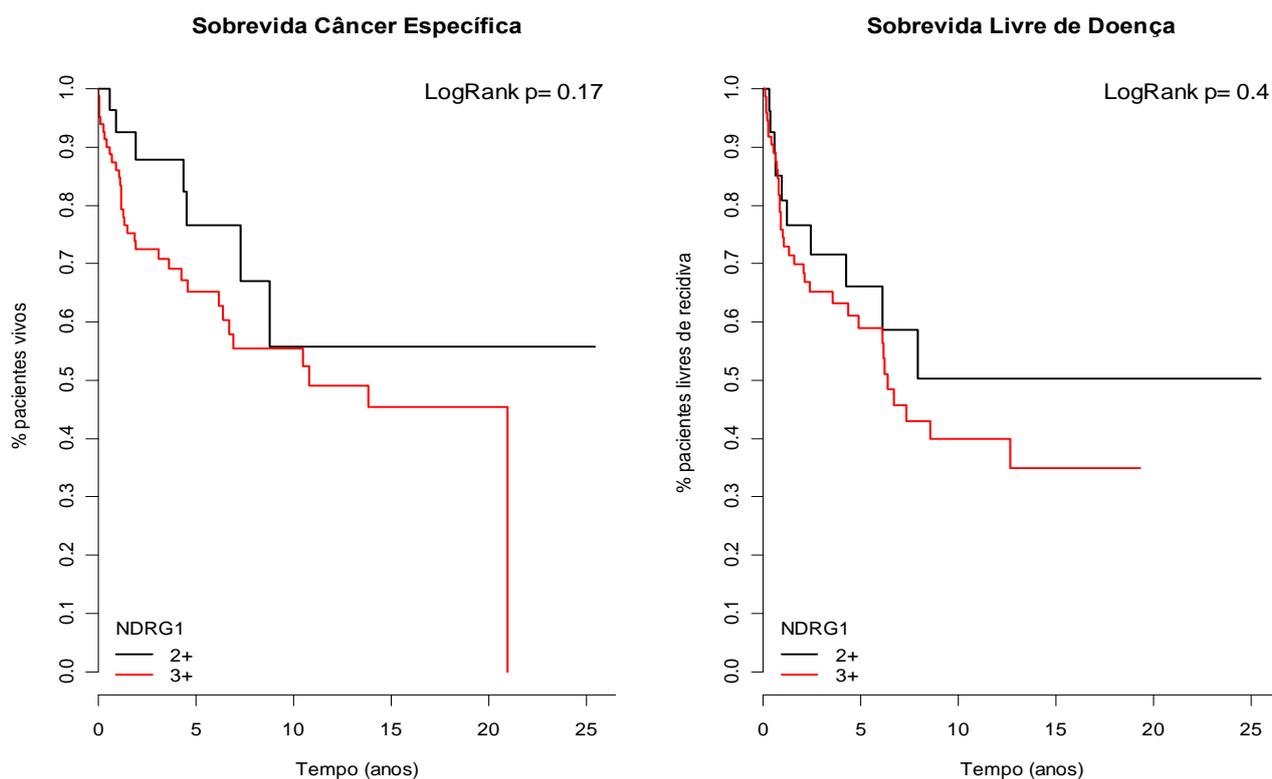


Figura 32 - Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador NDRG-1 no citoplasma/membrana

Tabela 36 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador NDRG-1 no citoplasma/membrana

Sobrevida em 5 anos	SCE				SLD		
	Escore ^a	n	RR	P	n	RR	p
NDRG1							
citoplasma/membrana	2+	28	1.00	0.17	27	1.00	0.4
	3+	83	1.77		77	1.35	

RR: Risco Relativo

^a Análise estatística realizada considerando-se os escores 2+ e 3+ (negrito).

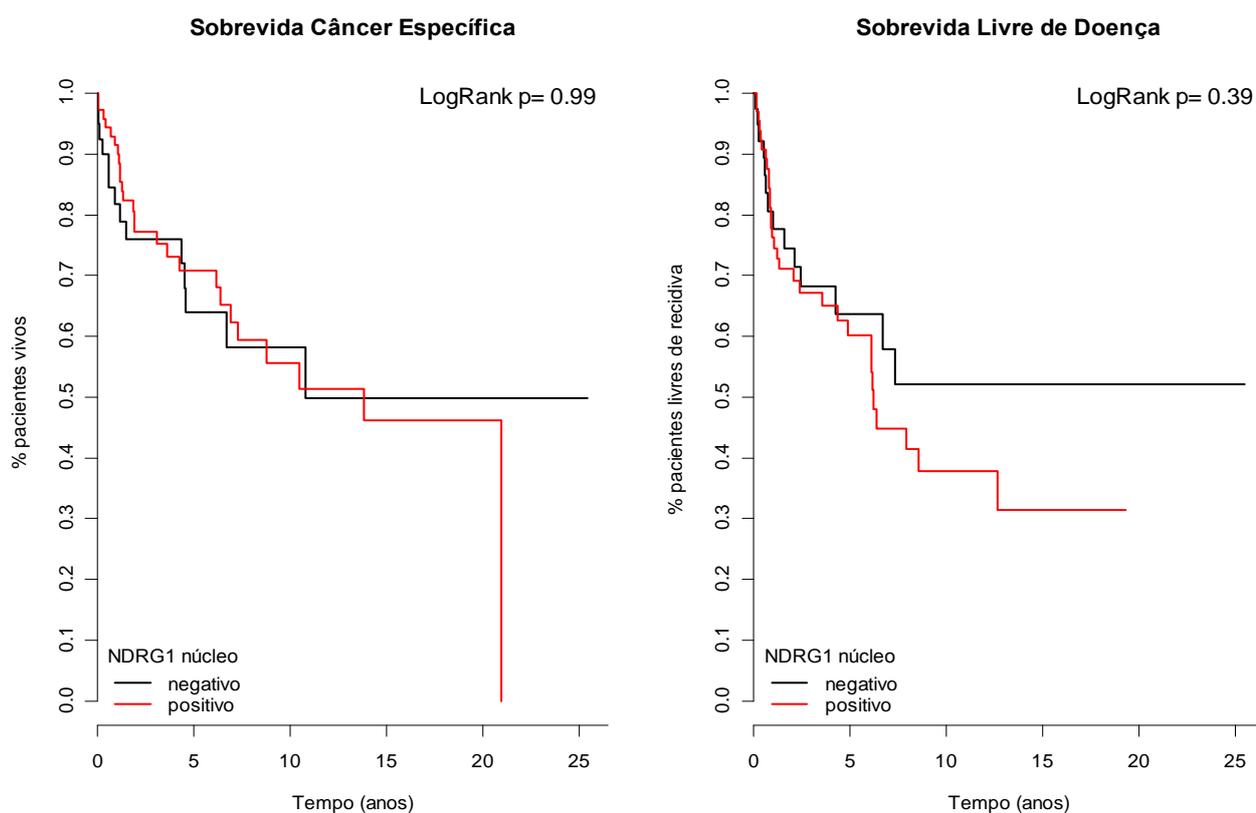


Figura 33 - Curvas de sobrevivida Câncer Específica e Livre de Doença para o marcador NDRG-1 com marcação nuclear.

Tabela 37 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para o marcador NDRG-1 nuclear.

Sobrevida em 5 anos	SCE				SLD		
	Categoria	n	RR	P	N	RR	P
Sobrevida em 5 anos	Negativo	40	1.00	0.99	40	1.00	0.39
NDRG-1 nuclear	Positivo	74	1.72		67	1.70	

Legenda:

RR: Risco Relativo

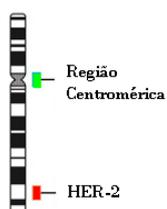
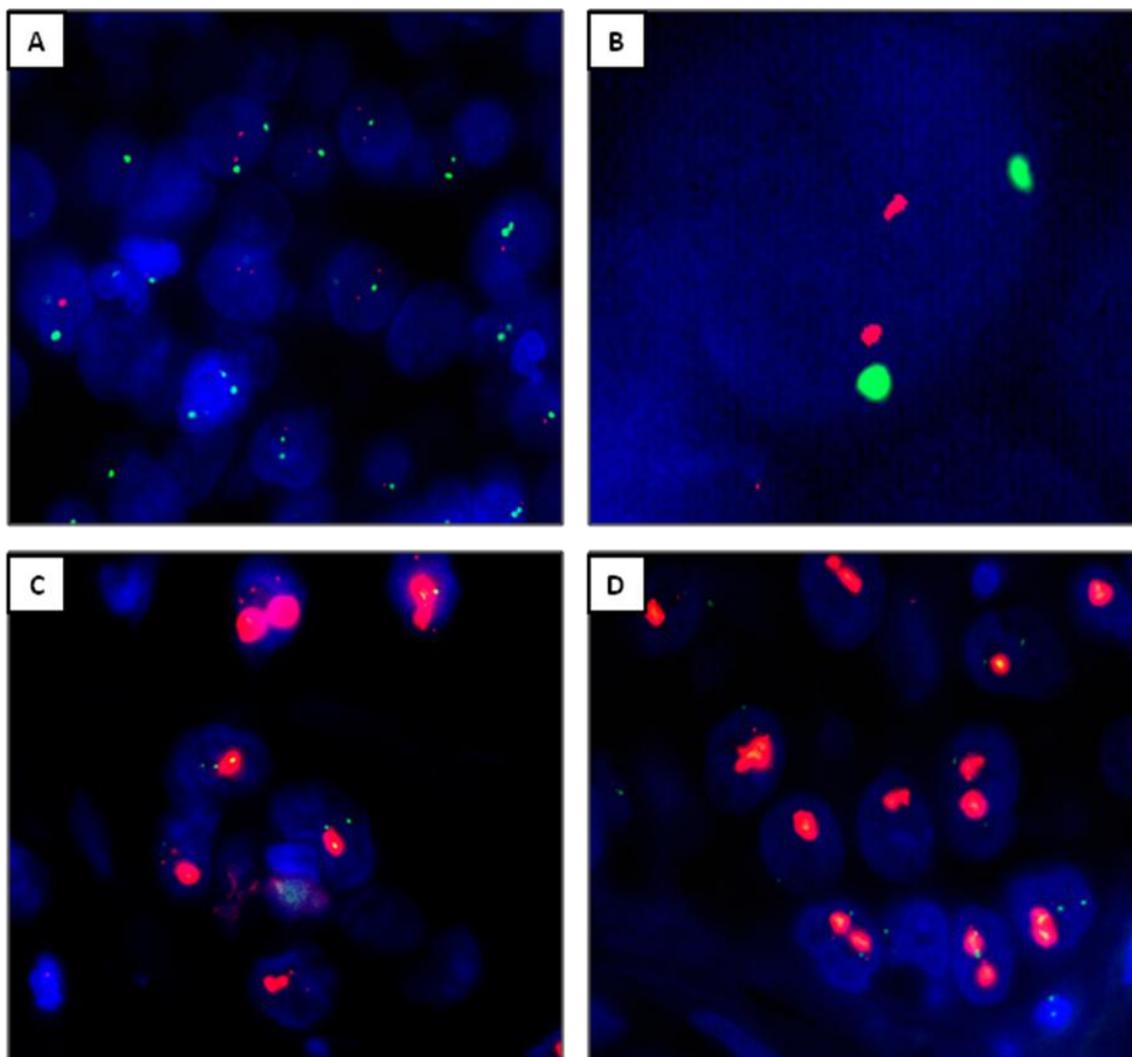
5.4 FISH

5.4.1 HER-2

Análises de FISH para HER-2 (**Figura 34**) demonstraram 96,84% dos casos sem alterações gênicas. Amplificação foi observada em 2 casos (2,11%) e polissomia em 1 caso, o equivalente a 1,05%. (**Tabela 38**). Em todos os tumores nos quais foi observada amplificação de HER-2 ocorreu também marcação imunohistoquímica intensa escore 3+, demonstrando uma correlação de 100% entre a IIQ e o FISH para HER-2. Dentre os 139 casos, 44 foram não avaliáveis pelo FISH, pela ausência de sinais fluorescentes nestas amostras ou perda do *spot* correspondente.

Tabela 38 - FISH para os genes HER-2/CEP17 em carcinomas de vulva.

HER-2		
	N	%
Sem alteração	92	96,84
Com alteração	3	
<i>Amplificação</i>	2	2,11
<i>Polissomia</i>	1	1,05
Total	95	



Legenda: **A** e **B**: FISH para HER-2/CEP17. Sinais em vermelho indicam o gene HER-2 e sinais verdes a região centromérica do cromossomo 17 (CEP17). **A** e **B**: nenhuma alteração observada; **C** e **D**: amplificação de HER-2

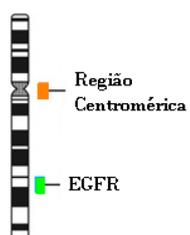
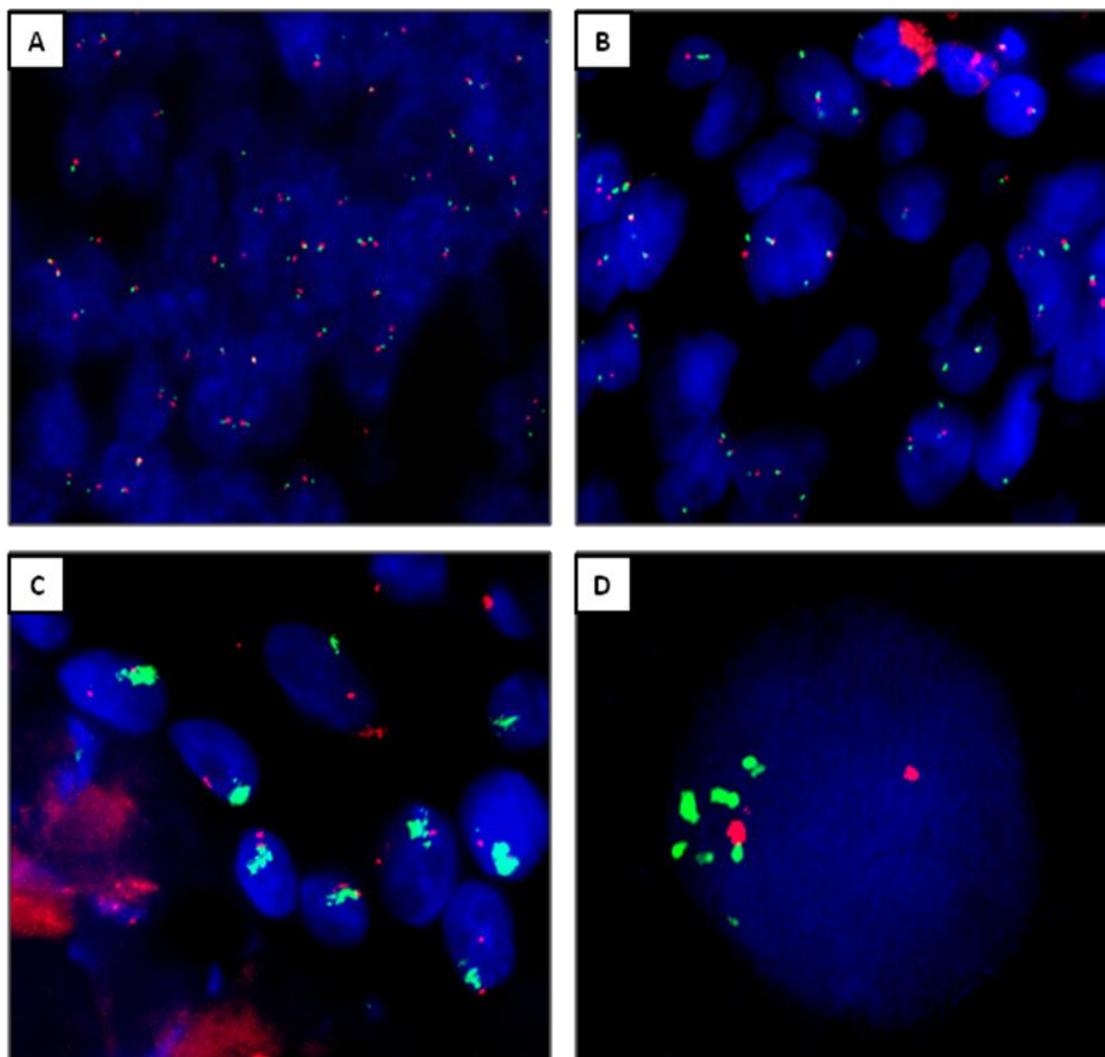
Figura 34 - Hibridação in situ fluorescente (FISH) para HER-2 em carcinomas de vulva.

5.4.2 EGFR

A análise de FISH para o gene EGFR, ilustrada na **Figura 35** demonstrou, em 93,59% dos casos, ausência de ampliações gênicas. Em 5 casos foi detectada amplificação, o equivalente a 6,41% das amostras, como mostrado na **Tabela 39**. Uma correlação de 100% entre os resultados da imunohistoquímica e do FISH foi obtida para o EGFR: os 5 tumores com marcação intensa 3+ da proteína EGFR apresentaram amplificação do gene. Sessenta e um casos foram não avaliáveis pelo FISH.

Tabela 39 - FISH para os genes EGFR/CEP7 em carcinomas de vulva.

EGFR		
	n	%
Sem alteração	73	93,59
Com alteração	5	6,41
<i>Amplificação</i>	5	6,41
Total	78	



Legenda: **A:** FISH para EGFR/CEP7. Sinais em verde indicam o gene EGFR e sinais alaranjados a região centromérica do cromossomo 7 (CEP7). **B:** Trissomia do gene EGFR; **C e D:** amplificação.

Figura 35 - Hibridação in situ fluorescente (FISH) para EGFR em carcinomas de vulva.

5.4.3 c-MYC

Alterações gênicas em c-MYC foram observadas em 69,86% das amostras (**Tabela 40**). Dentre estas alterações, 49,02% foram ampliações, 49,02% alterações numéricas e em um caso houve translocação do gene c-MYC com o gene da IgH - t(8;14), sendo que neste caso também houve a presença de amplificação, como mostra a **Figura 36**. Em 66 casos não foi realizada avaliação pelo FISH por perda do *spot* ou ausência de sinais fluorescentes.

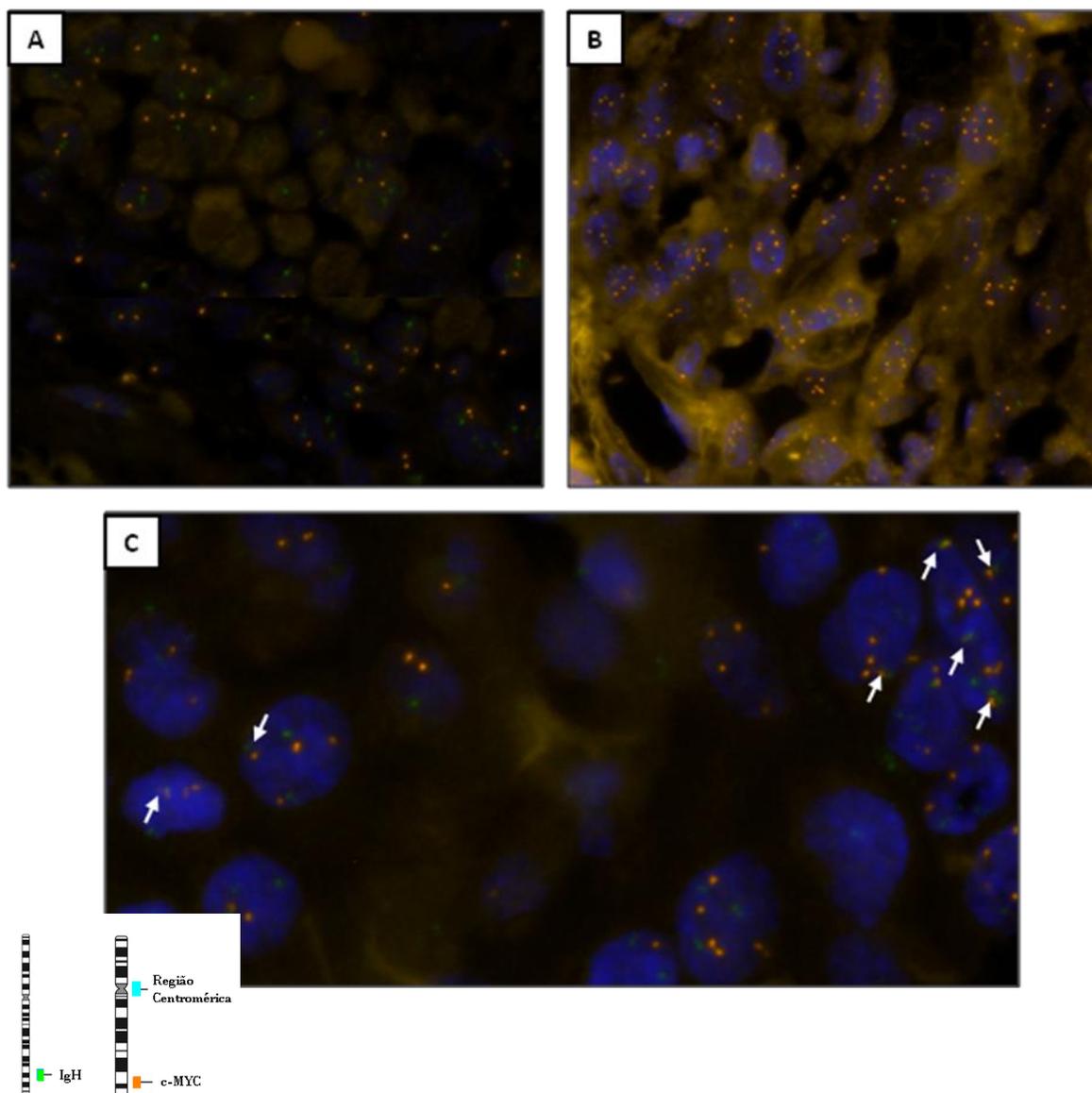
Na comparação dos resultados de expressão gênica pelo FISH versus protéica pela IIQ, observou-se que em 81% dos casos sem alterações gênicas, não houve expressão protéica, ao passo que dentre os casos em que foram observadas alterações no gene, apenas 18% dos casos foram positivos na IIQ (**Tabela 41**).

Tabela 40 - FISH para o gene c-MYC em carcinomas de vulva

c-MYC		
	N	%
Sem alteração	22	30,14
Com alteração	51	69,86
<i>Amplificação</i>	25	49,02
<i>Alteração numérica</i>	25	49,02
<i>Translocação+amplificação</i>	1	1,96
Total	73	

Tabela 41 - Comparação FISH vs Imunoistoquímica para o gene c-MYC

c-MYC IIQ	c-MYC FISH n(%)		Total
	Sem alterações	Com alterações	
Negativo	17 (81)	40 (82)	57
Positivo	4 (19)	9 (18)	13
Total	21	49	70



Legenda: Em amarelo, observa-se o gene c-MYC e em verde, observa-se o gene da IgH. **A:** FISH negativo para n-MYC (Sem alterações); **B:** Amplificação de c-MYC; **C:** Amplificação e translocação de c-MYC/IgH t(8;14) (setas brancas).

Figura 36 - Hibridação in situ fluorescente (FISH) para c-MYC em carcinomas de vulva

5.4.4 n-MYC

Mais da metade dos tumores (68,85%) não demonstrou alteração gênica em n-MYC, ao passo que 31,14% apresentaram algum tipo de alteração, sendo a mais frequente as alterações numéricas (84,21% dos tumores com alterações) e ampliações em 15,79%. Setenta e oito casos não puderam ser avaliados pela técnica de FISH (perda do *spot* ou ausência dos sinais fluorescentes). Estes dados estão mostrados na **Tabela 42** e a hibridação da sonda está ilustrada na **Figura 37**.

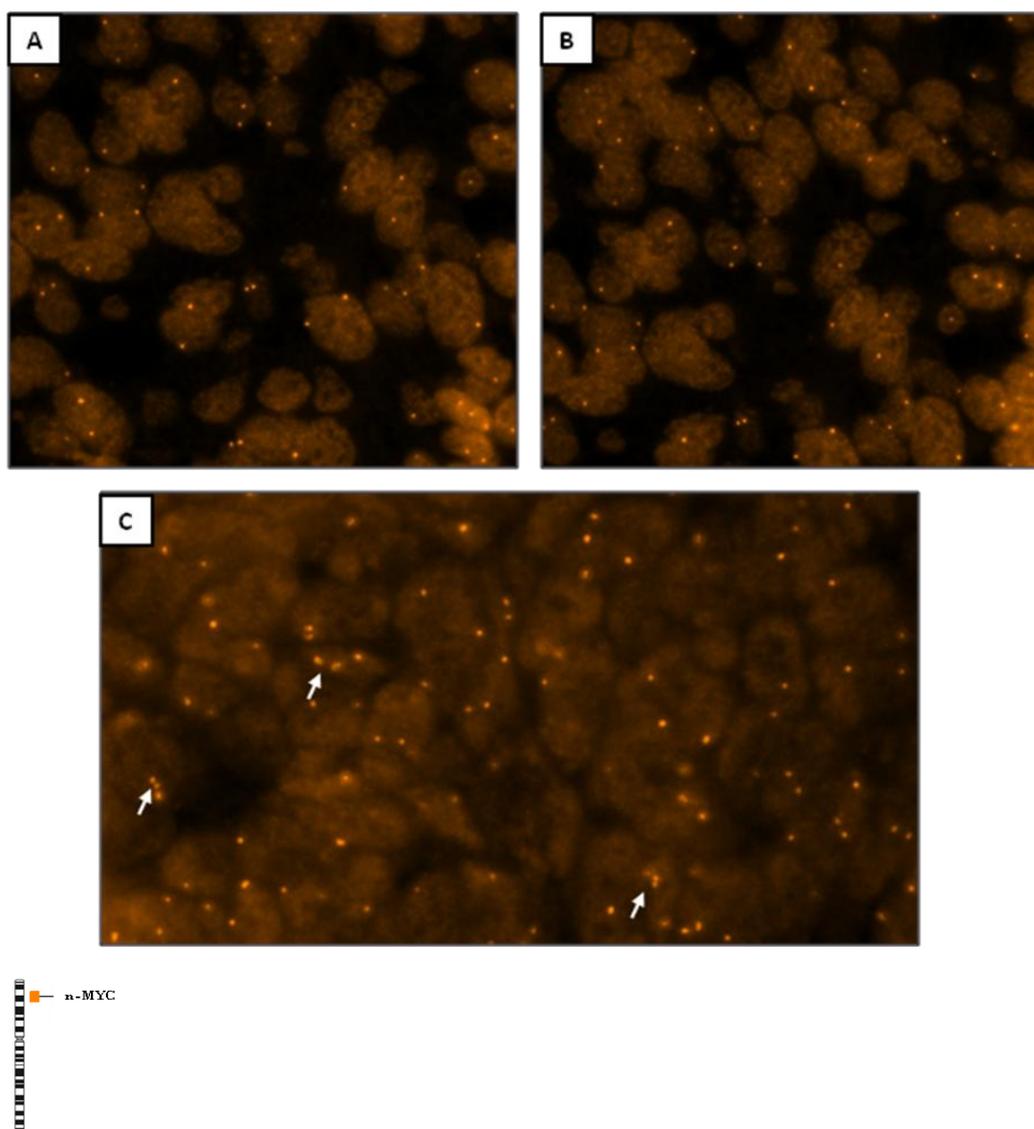
A comparação dos resultados de imunistoquímica versus FISH mostrou que, dentre os casos sem alterações gênicas de n-MYC, 54% não mostraram expressão protéica, ao passo que dentre os casos onde foram observadas alterações gênicas, 78% foram positivos para a proteína (**Tabela 43**). A comparação das duas técnicas foi possível em 57 amostras já que, dentre os 61 casos com resultados para o FISH, em 4 houve a perda do *spot* na imunistoquímica.

Tabela 42 - FISH para o gene n-MYC em carcinomas de vulva.

	n-MYC	
	n(%)	
	N	%
Sem alteração	42	68,85
Com alteração	19	31,15
<i>Amplificação</i>	3	15,79
<i>Alteração numérica</i>	16	84,21
Total	61	

Tabela 43 - Comparação FISH vs Imunoistoquímica para o gene n-MYC

n-MYC IIQ	n-MYC FISH		Total
	n(%)		
	Sem alterações	Com alterações	
Negativo	21 (54)	4 (22)	25
Positivo	18 (46)	14 (78)	32
Total	39	18	57



Legenda: O gene n-MYC está marcado em laranja. Esta sonda não apresenta marcação centromérica. **A e B:** FISH negativo para n-MYC (sem alterações); **C:**

Amplificação do gene n-MYC: *clusters* do gene indicados nas setas brancas.

Figura 37 - Hibridação in situ fluorescente (FISH) para n-MYC em carcinomas de vulva.

5.5 GENOTIPAGEM DE HPV

A genotipagem de HPV foi realizada em 105 casos e os principais achados estão ilustrados na **Tabela 44**. Foi detectada positividade para o vírus em 39,81% das amostras, sendo que, dentre os tipos infectantes mais comuns estavam o HPV 16 (34,62%), seguido do HPV 33 (23,08%). Quase 81% das pacientes apresentavam somente um tipo infectante de HPV. No entanto, infecção concomitante de dois tipos virais diferentes foi observada em 7,32% dos tumores e de três tipos virais em 12,20% (**Tabela 45**).

Tabela 44 - Genotipagem de HPVs em carcinomas de vulva e tipos infectantes.

Genotipagem HPV	Resultados	
	N	%
Negativo	62	60,19
Positivo	43	39,81
Tipos Infectantes		
<i>HPV 16</i>	18	34,62
<i>HPV 18</i>	4	7,69
<i>HPV 33</i>	12	23,08
<i>HPV 35</i>	3	5,77
<i>HPV 42</i>	1	1,92
<i>HPV 45</i>	1	1,92
<i>HPV 53</i>	4	7,69
<i>HPV 54</i>	2	3,85
<i>HPV 67</i>	2	3,85
<i>HPV 69</i>	1	1,92
<i>HPV 71</i>	2	3,85
<i>HPV 82</i>	1	1,92
<i>HPV 84</i>	1	1,92

Tabela 45 - Distinção entre quantidade de tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.

Genotipagem HPV	n	%
1 tipo infectante	33	80,49
2 tipos infectantes	3	7,32
<i>Subtipo</i>		
16+33	2	66,66
42+54	1	33,33
3 tipos infectantes	5	12,20
<i>Subtipo</i>		
16+33+84	1	20
18+33+35	1	20
33+18+16	1	20
33+31+82	1	20
33+35+16	1	20

A distribuição dos dados epidemiológicos das pacientes do estudo em relação aos tipos de HPVs infectantes mostrou uma média de idade menor das pacientes HPV positivas (66,3 anos) em relação às HPV negativas (72,6 anos), sendo que no primeiro grupo, a idade mínima foi de 15 anos, enquanto no segundo foi de 48 anos. Além disso, mulheres HPV positivas apresentaram médias de idade de coitarca menores do que as mulheres HPV negativo (19,9 do primeiro grupo com idade mínima de 11 anos versus 21,9 do segundo). Dentre as pacientes que relataram nenhum ou um parceiro durante a vida, a maior parte não estava infectada pelo vírus. Em relação ao estado civil, 54% das mulheres sem HPV eram casadas, ao passo que 56% das mulheres com HPV eram solteiras. Outros dados como menopausa, etilismo e tabagismo estão disponíveis na **Tabela 46**. A

variação do n amostral entre as diferentes variáveis se deve à falta de dados disponíveis nos prontuários.

Tabela 46 - Distribuição dos dados epidemiológicos das pacientes em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.

HPV vs Dados epidemiológicos					
Variáveis	Categoria	HPV		Total	P
		Negativo	Positivo		
Idade ao diagnóstico	N	45	40		
	média (desvio padrão)	72.6 (10.5)	66.3 (14.7)		
	Mediana	72.3	69		
	mínimo – máximo	48 - 99	15 - 90	-	-
Menopausa	N	33	32		
	média (desvio padrão)	49.8 (6.1)	50.5 (4.5)		
	Mediana	51	50		
	mínimo - máximo	38 - 64	39 - 60	-	-
Coitarca	N	17	11		
	média (desvio padrão)	19.9 (3.7)	21.9 (8.1)		
	Mediana	21	20		
	mínimo - máximo	15 - 26	nov/43	-	-
Número de parceiros		n(%)			
	Nenhum	2(67)	1(33)	3	
	1	18(58)	13(42)	31	
	2	1(100)	0	1	
	4	1(50)	1(50)	2	-
Raça	Branca	38 (50)	38 (50)	76	
	Não branca	9 (75)	3 (25)	12	N.A.
Etilismo	Não	42 (53)	37 (47)	79	
	Sim, no passado	0 (00)	1 (1.00)	1	N.A.
Tabagismo	Não	37 (55)	30 (45)	67	
	Sim, atualmente	1 (14)	6 (86)	7	
	Sim, no passado	5 (71)	2 (29)	7	N.A.
	Casadas/viúva/separadas	32 (54)	18 (44)	50	
Estado Civil	Solteiras	27 (46)	23 (56)	50	0.30
	Analfabeto ou 1º grau	40 (75)	30 (77)	70	
Escolaridade	2º grau ou mais	13 (25)	9 (23)	22	0.87

Legenda:

N.A.: Valor de p não avaliável

Em relação ao diagnóstico histológico, a positividade para o HPV se deu, principalmente, dentre os casos classificados como CEC2 (42%). Entretanto, dentre os 18 casos de tipo histológico basalóide, 13 eram HPV positivo ($p=0,01$). Todas estas características estão ilustradas na **Tabela 47**. Curvas de sobrevida para a presença de HPV dentre as amostras estão ilustradas na **Figura 38**, as quais não demonstraram valor de significância estatística em relação à presença ou ausência do vírus.

Tabela 47 - Distribuição das variáveis anatomo-patológicas e clínicas em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas de vulva.

HPV vs Variáveis anatomo-patológicas e clínicas					
Variáveis	Categoria	HPV n(%)		Total	P
		Negativo	Positivo		
Diagnóstico histológico	CEC 1/Carcinoma verrucoso	24 (40)	12 (28)	36	0.01
	CEC2	31 (52)	18 (42)	49	
	CEC3/Carcinoma basalóide	5 (8)	13 (30)	18	
Profundidade da invasão	Derme superficial ou derme	31 (52)	26 (62)	57	0.30
	Derme profunda ou subcutâneo	29 (48)	16 (38)	45	
Infiltrado inflamatório	Leve (1+)	17 (29)	11 (26)	28	0.91
	Moderado (2+)	36 (61)	28 (65)	64	
	Intenso (3+)	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	0.42
	Sim	9 (16)	4 (10)	13	
Metástase linfonodal	Não	19 (59)	18 (69)	37	0.43
	Sim	13 (41)	8 (31)	21	
Lesões Associadas	Não	46 (81)	28 (68)	74	0.15
	Sim	11 (19)	13 (32)	24	
Estadiamento FIGO	I ou II	37 (61)	28 (67)	65	0.53
	III ou IV	24 (39)	14 (33)	38	

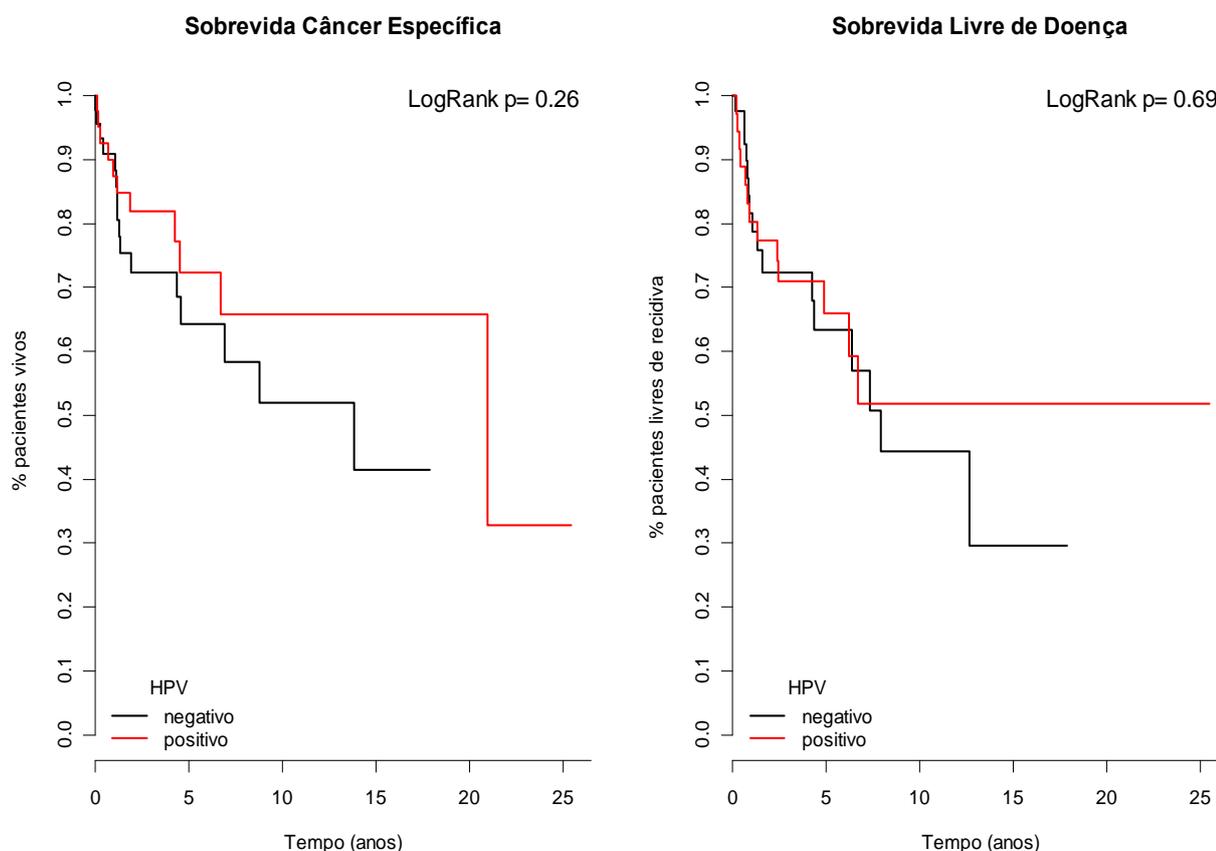


Figura 38 – Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para a presença de HPV entre os tumores.

Tabela 48 - Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para a presença de HPV entre os tumores

Sobrevida em 5 anos	Categoria	n	SCE		SLD		
			RR	P	N	RR	p
HPV	Sim	41	1	0.26	37	1	0.69
	Não	47	1.56		43	1.16	

Legenda:

RR: Risco Relativo

Finalmente, relacionado à distribuição da expressão dos marcadores avaliados pelo presente estudo em relação à infecção pelo HPV (**Tabela 49**), ainda que não tenha havido grau de significância estatística ($p=0,08$),

observou-se que 85% dos tumores HPV positivos eram c-KIT positivos. Sessenta e seis por cento dos tumores positivos para HPV eram escore 0 para EGFR e escores 1+,2+ ou 3+ para n-MYC. Notou-se uma distribuição semelhante dos casos HPV positivo e negativo em relação aos escores 0 e 1+ para HER-2. Esta distribuição semelhante entre os grupos também foi observada nos grupos de escores 2+ e 3+ para NDRG-1 e nas análises de c-MYC, o que não permitiu análises estatísticas em relação a estes marcadores.

Tabela 49 - Distribuição da expressão imunoistoquímica dos oncogenes avaliados em relação à positividade do HPV em carcinomas de vulva.

HPV vs oncogenes					
Marcador	Categoria	HPV		Total	p
		Negativo	Positivo		
c-KIT	Negativo	18 (31)	6 (15)	24	
	Positivo	41 (69)	34 (85)	75	0.08
EGFR	Escore 0	34 (61)	25 (66)	59	
	Escores 1+,2+,3+	22 (39)	13 (34)	35	0.62
n-MYC	Escore 0	22 (41)	13 (34)	35	
	Escores 1+,2+,3+	32 (59)	25 (66)	57	0.53
c-MYC	Negativo	11 (19)	13 (33)	24	
	Positivo	47 (81)	27 (68)	74	0.12
HER-2 (escore)	0	39 (53)	35 (47)	74	
	1+	2 (67)	1 (33)	3	
	2+	2 (100)	0	2	
	3+	1 (100)	0	1	N.A.
NDRG-1 (escore)	0	0	1 (100)	1	
	1+	0	1 (100)	1	
	2+	7 (54)	6 (46)	13	
	3+	29 (53)	26 (47)	55	N.A.

Legenda:

N.A.: Valor de p não avaliável

DISCUSSÃO

*“Science is built up of facts, as a house is built of stones;
but an accumulation of facts is no more a science
than a heap of stones is a house”.*

Henri Poincaré (Science and Hypothesis, 1905)

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CASUÍSTICA DO ESTUDO

De modo semelhante ao consenso da literatura no que diz respeito à média de idade das pacientes em relação ao aparecimento do carcinoma vulvar, nossos resultados mostraram que a maior parte das pacientes possuía idade compreendida entre a sétima e oitava décadas de vida (BUXANT et al. 2005; DE HULLU e VAN DER ZEE 2006; LANNEAU et al. 2009). Da mesma forma, foi observado em nossa casuística um aumento da incidência deste tipo de tumor acompanhado pelo aumento da idade das pacientes, assim como relatado anteriormente por outros autores (JUDSON et al. 2006).

Apesar da maior parte das pacientes pertencerem ao grupo de mulheres entre 59 e 80 anos, outras pacientes mais jovens, a partir de 15 anos, também fizeram parte da casuística. No entanto, pelo pequeno número de doentes incluídas neste grupo, não houve a possibilidade de se estabelecer com clareza as vias etiopatogênicas distintas do carcinoma de vulva descritas na literatura, que aponta que tumores desenvolvidos em mulheres de idade mais jovem são diretamente dependentes da infecção pelo HPV, displasia vulvar e fumo, ao passo que no grupo de mulheres mais idosas, mutações em TP53, inflamações crônicas, irritação e distrofia vulvar

parecem ser os fatores etiogênicos para o carcinoma de vulva (HØRDING et al. 1994; LANNEAU et al. 2009).

Ao contrário do que ocorre em câncer de mama, no qual pacientes mais jovens apresentam pior prognóstico (MAGGARD et al. 2003; KUMAR et al. 2009), no carcinoma de vulva, mulheres mais velhas apresentam pior prognóstico, provavelmente devido a fatores genéticos, do envelhecimento e comportamento. Além disso, tumores associados ao HPV, que por sua vez é considerado um preditor independente de melhor sobrevida, parecem ter melhor prognóstico quando comparados aos que apresentam mutações em TP53, fator etiopatogênico comum no grupo de mulheres acima de 50 anos (KUMAR et al. 2009). Este aspecto não pode ser avaliado no presente estudo em decorrência do baixo número de pacientes com idade abaixo de 50 anos.

Em relação à raça das pacientes, nosso estudo mostra resultado semelhante ao consenso da literatura (SARAIYA et al. 2008; WATSON et al. 2009) e de um estudo prévio realizado em nossa instituição (PINTO et al. 1999) de que a maioria das mulheres acometidas por este tumor eram da raça branca. Já em relação ao nível educacional das pacientes, o alto número de mulheres analfabetas ou com educação básica observado parece refletir no alto número de gestações (média de 6 gestações por mulher) e na baixa adesão ao uso de contraceptivos orais (5,5% das pacientes fizeram uso no passado). É bem sabido que mulheres com menor escolaridade possuem menor acesso à informação no que diz respeito ao comportamento sexual, higiene e doenças sexualmente transmissíveis, na qual o HPV é um

fator de risco importante para o desenvolvimento do carcinoma vulvar, além de uma maior dificuldade em acessar os serviços de saúde, muitas vezes não participando de programas de prevenção em serviços ginecológicos.

É importante considerar que, uma vez que a maior parte das pacientes incluídas na nossa casuística representava o grupo de mulheres mais velhas (acima de 70 anos de idade), fatores comportamentais parecem ser importantes no que diz respeito à presença de um único parceiro sexual durante a vida relatado pela maioria das pacientes, além da baixa aderência a contraceptivos orais, fumo e álcool, características tradicionalmente não associadas a esta faixa etária. Cabe ainda ressaltar que o preenchimento dos prontuários médicos de modo incompleto ou o fornecimento incorreto da informação por parte das pacientes acerca dos fatores supracitados pode ter subestimado o número de mulheres que fazem uso de contraceptivos orais, fumo e álcool.

Finalmente, em relação à sobrevida das pacientes, nossos dados mostram uma sobrevida câncer específica em 5 anos de cerca de 70%, o que mostra-se melhor que outros dados disponíveis na literatura, de 50% (BUXANT et al. 2005). Este dado nos permite inferir que nossa casuística pode apresentar tumores de curso mais indolente já que, em sua maioria, foram histologicamente classificados como tumores bem diferenciados ou moderadamente diferenciados, como será abordado a seguir, além de terem sido pertencentes, em sua maioria, ao grupo de tumores de estadiamento menos avançado – IB, predominantemente (58,91% dos tumores avaliados).

6.2 ASPECTOS ANATOMO-PATOLÓGICOS E CLÍNICOS DAS PACIENTES DO ESTUDO

As características anatomo-patológicas investigadas pelo presente estudo mostraram uma tendência de melhor prognóstico dos tumores avaliados: grande parte das neoplasias pertenceu ao grupo de carcinomas epidermóides moderadamente diferenciados e bem diferenciados, sendo que tumores moderadamente a pouco diferenciados pareceram refletir em uma pior sobrevida das pacientes em relação aos tumores mais bem diferenciados. De modo semelhante, NICOLETTO et al. (2010) descrevem que tumores de grau histológico 1 ou 2 predizem melhor sobrevida livre de doença.

Em relação ao acometimento linfonodal, foi observado algum grau de acometimento em 28,06% das pacientes, sendo que dentre as mulheres que apresentaram linfonodos positivos, foram observadas sobrevidas menores do que entre aquelas sem nenhum acometimento linfonodal. O acometimento de linfonodos é um dos principais fatores prognósticos do carcinoma de vulva estando, inclusive, incorporado ao estadiamento de neoplasias da FIGO (MOORE et al. 2009).

São escassos na literatura trabalhos no que se refere à análise histopatológica de carcinomas de vulva, o que inviabiliza a comparação de muitos de nossos achados com os relatados por outros autores. Em nossa casuística, apenas uma pequena parcela das pacientes apresentou tumores com invasão vascular (15,11%) ou perineural (10,79%). LERMA et al. (1999)

detectaram uma menor porcentagem de invasão vascular (4,3%) e maior de invasão perineural (21,4%). Entretanto, este estudo contemplou um número menor de casos, e fatores como a experiência do patologista e o número de lâminas analisadas para cada caso influenciam no resultado anatomo-patológico. Finalmente, entre os tumores analisados pelo nosso estudo, infiltrado inflamatório moderado foi observado em número maior de casos (74,36% dos casos) que o estudo previamente citado, em que foi detectado em 35,3% (PINTO et al. 1999). A densidade do infiltrado parece estar associada com melhor sobrevida em carcinoma de vulva: pacientes com infiltração plasmolinfocítica moderada a severa parecem apresentar melhor sobrevida em relação às que tiveram infiltrado leve ou nenhum infiltrado. Entretanto, o papel exato dos fatores imunológicos envolvidos na resposta inflamatória requer maiores estudos (ANDREASSON et al. 1982; HOMESLEY et al.1993; PINTO et al. 1999).

No que diz respeito aos sintomas apresentados pelas pacientes, o mais comumente relatado foi o prurido, como também mostrado por outros autores (DE HULLU et al. 2006; LANNEAU et al. 2009) e a maior parte das pacientes apresentaram sintomas por cerca de 6 meses (LANNEAU et al. 2009), sendo que houve pacientes que apresentaram sintomas por até 10 anos, o que reflete a falta de informação e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde como resultado dos fatores abordados anteriormente. Deste modo, como proposto por JOURA et al. (2000), o aumento da incidência da neoplasia vulvar, principalmente em mulheres jovens, torna aumentada a demanda por cuidados em relação à sintomatologia destas

pacientes. Muitas mulheres com câncer invasivo possuem um longo histórico de sintomas vulvares e passam por investigação e tratamento inadequados das lesões precursoras. Desta forma, o exame cuidadoso da vulva, bem como o encorajamento ao auto-exame podem facilitar a detecção precoce não somente dos carcinomas invasivos, como também das lesões precursoras, permitindo aumento das taxas de sobrevida das pacientes, bem como um manejo mais conservador desta neoplasia, permitindo preservação anatômica e da função sexual das pacientes.

De modo semelhante ao observado por outros autores, grande parte das pacientes do nosso estudo apresentou a doença em estádios precoces, principalmente FIGO IB (SCHEISTRØEN et al. 2002; DE HULLU et al. 2006; LANNEAU et al. 2009). Este achado é consistente com o fato de que o carcinoma vulvar possui crescimento lento e tende a permanecer localizado por um grande período de tempo (MAGGINO et al. 2000; SCHEISTRØEN et al. 2002). Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier mostraram, dentre a nossa casuística, uma diminuição da sobrevida global das pacientes quanto maior o estadiamento do tumor, o que aponta na mesma direção da própria classificação de estágio da FIGO.

O fato de o presente estudo contemplar uma série histórica de pacientes parece se refletir no tratamento de escolha do tratamento cirúrgico para a maioria das pacientes: vulvectomy radical tripla-incisão foi realizada em 57,27% das pacientes, já que era o tratamento de escolha do presente Hospital na época em que a maior parte das pacientes foi operada.

A abordagem cirúrgica é o tratamento mais comum para o carcinoma de vulva (COULTER e GLEASON 2003; KNOPP et al. 2009), tendo sofrido várias modificações durante os anos, e varia de uma excisão local de pequenos tumores até uma combinação de ressecção ampla da vulva com linfadenectomia ipsilateral ou bilateral inguinfemoral e pélvica, bem como radioterapia e quimioterapia pré e pós cirúrgicas nos tumores maiores e nos metastáticos (GHURANI e PENALVI 2001; SCHEISTRØEN et al. 2002; DE HULLU et al. 2006; KNOPP et al. 2009).

Apesar da vulvectomy radical tripla incisão ter sido introduzida visando reduzir as taxas de morbidade e mortalidade comparadas às da vulvectomy radical clássica (*en bloc*), complicações e recorrências ainda são motivo de preocupação na decisão clínica (PODRATZ et al. 1983; ANDERSEN e HACKER 1983; MOORE et al. 2009). Dentre nossa casuística, 54,54% das pacientes apresentaram complicações da cirurgia, sendo deiscência da ferida a mais comum, seguida de infecção e necrose do retalho. Além disso, problemas psicosexuais, não avaliados no presente projeto, são amplamente descritos na literatura, principalmente entre as pacientes mais jovens: medo, distorção da imagem corporal e depressão estão entre os mais citados (DE HULLU e VAN DER ZEE 2006).

De acordo com COULTER e GLEASON (2003), o carcinoma vulvar apresenta recorrência em um terço das pacientes, dado semelhante ao obtido pelo nosso estudo: 38,58% das pacientes apresentaram algum tipo de recidiva (local, linfonodal, à distância ou locorregional + à distância). Dentre estas pacientes, as taxas de sobrevida câncer específica foram menores do

que aquelas que não apresentaram qualquer recidiva. O tamanho da lesão, margens de ressecção menores de 1 cm e status dos linfonodos no momento da cirurgia são os maiores preditores de recorrência em carcinomas de vulva (COULTER e GLEASON 2003). Em relação ao tipo de recorrência, nossos dados são similares aos apresentados por outros autores, com exceção da recorrência local, que foi observada em menor porcentagem do que a observada na literatura: 41,30% da nossa casuística versus 53-86% da literatura, como descrito por PIURA et al. 1993; MAGGINO et al. 2000; COULTER e GLEASON 2003; SCHEISTRØEN et al. 2006. Já a recidiva linfonodal foi observada em 26,08%, sendo relatada na literatura entre 11-38% (PREMPREE e AMORNMARN 1984; BRANDENBERGER et al. 1992; PIURA et al. 1993; MAGGINO et al. 2000). É sabido que o risco de metástase linfonodal em tumores primários parece estar relacionado à profundidade de invasão e tamanho do tumor, bem como invasão do espaço vascular (COULTER e GLEASON 2003). Recidiva à distância foi observada em 10,86% (variando de 8-37%, de acordo com PREMPREE e AMORNMARN 1984; MAGGINO et al. 2000).

A partir do exposto acima, é importante que, em carcinomas de vulva, tanto a seleção cuidadosa das pacientes que podem ser submetidas a cirurgias menos radicais para evitar a tratamento desnecessário, quanto a abordagem individualizada de modo a evitar tratamento subestimado, devem ser rigorosamente avaliados. Além disso, um tempo maior de acompanhamento das pacientes é importante após a cirurgia, uma vez que

recorrências podem ser vistas vários anos após a terapia primária (SCHEISTRØEN et al. 2002).

Uma vez que o carcinoma vulvar é uma neoplasia relativamente rara, existe dificuldade em se realizar ensaios clínicos fase III para se obter protocolos de terapia de excelência para as pacientes, bem como em encontrar marcadores com papel de indicadores prognósticos. Esforços constantes têm sido realizados por vários grupos no que diz respeito a estes marcadores e, até então, é essencial que pacientes e serviços de saúde estejam atentos à importância da avaliação ginecológica contínua e políticas de educação devem ser reforçadas no país de modo a aumentar a conscientização não apenas a respeito do carcinoma de vulva, mas do câncer cervical e da infecção pelo HPV.

6.3 AVALIAÇÃO DOS ONCOGENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

6.3.1 Família ERBB: HER-2 e EGFR

Nosso estudo mostra um dado inédito na literatura em relação à correlação de 100% entre FISH e imunohistoquímica para HER-2 e EGFR em carcinomas de vulva.

No que diz respeito à amplificação de EGFR, nossos resultados corroboram os achados de GROWDON et al. (2008) na observação de que todos os tumores com intensa expressão 3+ desse receptor apresentaram amplificação de EGFR. No entanto, nossos dados mostram uma menor taxa de amplificação (5 casos, o equivalente a 6% do total) em relação ao estudo anterior, que observou quase 12%.

Hiperexpressão de EGFR (3+) por IHC foi observada em 3,60% dos nossos casos, dado contraditório com achados anteriores que relataram uma superexpressão de 41-68% para este receptor (JOHNSON et al. 1997; BRUSTMANN 2007; OONK et al. 2007). Dentre as correlações entre a expressão de EGFR e as características clínicas e anatomo-patológicas avaliadas, foi demonstrada associação de significância estatística marginal ($p=0,08$) em relação ao estadiamento do tumor, o que pode ser um indicativo de que a ativação desta molécula pode ser importante na progressão tumoral. Isto pode ser explicado pelo fato de que a ativação da via de EGFR promove, dentre outros, mobilidade celular, sobrevivência, invasão e

angiogênese, sendo que todos estes fatores resultam na modulação da progressão tumoral (JOHNSON et al. 1997; OONK et al. 2007).

É importante ressaltar que foi observada alta heterogeneidade da intensidade da marcação para EGFR nos tumores de vulva, como já havia sido descrita por BRUSTMANN (2007), o que pode ter sido o principal fator contribuinte para a falta de correlação entre os dados avaliados, bem como entre nosso estudo e outros da literatura. O estudo da avaliação deste marcador em cortes inteiros pode vir, no futuro, a elucidar melhor esta questão.

Um achado interessante em relação à expressão de HER-2 foi em relação à marcação citoplasmática observada em 21 casos avaliados, o equivalente a 15,11%. Esta expressão de HER-2 no citoplasma já havia sido citada por um artigo em carcinomas de vulva, entretanto, nenhuma associação foi realizada naquele estudo (HANTSCHMANN et al. 2005) e esta marcação parece ser frequentemente observada em exames imunohistoquímicos de rotina, mas é excluída da avaliação da positividade por ser, muitas vezes, considerada uma marcação inespecífica (HORIGUCHI et al. 2010). Entretanto, existe na literatura um grande debate em relação ao significado dessa reatividade citoplasmática e características clinicopatológicas e, apesar das implicações biológicas e clínicas desta marcação ainda serem desconhecidas, estudos recentes demonstraram que algumas formas variantes truncadas de HER-2 podem ter papel importante no câncer, principalmente de mama (MOLINA et al. 2001, 2002; ANIDO et al. 2006; HORIGUCHI et al. 2010; SCALTRITI et al. 2010).

Alguns autores que descrevem que a marcação citoplasmática refere-se à expressão de um fragmento truncado do receptor na porção NH₂ - terminal, chamado p95HER-2, que é produto da clivagem dependente de metaloproteases do receptor de comprimento total p185HER-2, e cuja expressão correlaciona-se com envolvimento linfonodal e pior prognóstico de pacientes em câncer de mama (MOLINA et al. 2001; Horiguchi et al. 2010; Scaltriti et al. 2010). Em nossa casuística, nos tumores com expressão citoplasmática de HER-2 não foram demonstradas diferenças significantes em relação às sobrevidas câncer específica e livre de doença.

Ainda que não tenham sido estatisticamente significantes, os dados de sobrevida apontam uma tendência de melhor sobrevida para as pacientes cujos tumores mostraram marcação de HER-2 citoplasmática em relação àquelas cujos tumores não apresentaram qualquer marcação desta natureza, dado nunca antes relatado em carcinomas vulvares. Na literatura não foram encontrados relatos relacionando menor sobrevida das pacientes em relação à marcação de HER-2 no citoplasma. Essapen et al. (2004) mostraram que, em câncer colorretal, existe uma sobrevida global significativamente maior quando observada marcação citoplasmática, o que reforça os nossos achados.

O fato de que o receptor HER-2 citoplasmático pode não ser capaz de transmitir o sinal mitogênico gerado via heterodimerização com os outros membros da família ERBB pode, parcialmente, explicar a possível correlação existente entre a hiperexpressão destas moléculas no citoplasma e a melhor sobrevida das pacientes. Entretanto, como previamente

ressaltado, não houve correlação estatística em relação à estas sobrevida e, até o presente momento, não existem dados disponíveis acerca da função biológica clara desta marcação em tumores e investigações futuras para identificar estes aspectos se fazem necessárias, de modo a avaliar a real ação deste fragmento do receptor em carcinomas de vulva.

Hiperexpressão de HER-2 na membrana foi encontrada em 1,44%, o equivalente a dois casos da nossa casuística. BERCHUCK et al. (1990) descreveram que, embora rara, esta superexpressão pode ser um indicativo de pior prognóstico em carcinomas de vulva (tumores mais indiferenciados, com invasão vascular, recorrência e morte por câncer). Este achado pode reforçar a tendência de pior prognóstico observada em nossa casuística, mas cabe ressaltar que não foi possível estabelecer este receptor como marcador molecular em carcinoma de vulva, em nossa casuística, devido ao pequeno número de casos positivos obtido.

De modo controverso, outros dois estudos em carcinomas de vulva demonstraram superexpressão deste receptor em cerca de 46-47%, valor muito maior do que o encontrado dentre a nossa casuística e em outros carcinomas nos quais HER-2 já é bem estabelecido, como tumores de mama, por exemplo, em que 20 a 30% de hiperexpressão é observada (GORDINIER et al. 1997; HANTSCHMANN et al. 2005; SCALTRITI et al. 2010). No entanto, apesar das divergências este dado e os nossos resultados, alguns estudos recentes (GILCREASE et al. 2009) mostraram que mesmo um baixo nível de expressão de HER-2 pode estar associado com piores resultados clínicos em câncer de mama e para os pacientes

inelegíveis para terapia anti-HER-2, um baixo nível de expressão de HER-2 também pode ser útil para ajudar a selecionar um regime de quimioterapia mais agressivo ou terapias alternativas no futuro. Isto pode significar que, independentemente da hiperexpressão de HER-2, as pacientes com carcinoma vulvar podem, no futuro, vir a se beneficiar do tratamento com anticorpos monoclonais e inibidores da atividade tirosina-cinase deste receptor ou mesmo de novos protocolos de quimioterapia ou terapia cirúrgica melhor compatíveis.

FUKUTOME et al. (2006) mostraram que a dupla inibição de HER-2 e EGFR por Trastuzumab e Gefitinib (ZD1839), respectivamente, diminuiu de forma importante o crescimento de células da linhagem humana de SCC de vulva, A431, que superexpressam EGFR fracamente e HER-2 moderadamente, além de aumentar a radiosensibilidade. Isto sugere que a dupla inibição destes membros da família ERBB aumenta a radiosensibilidade sinergicamente pela inibição das vias de ativação de sobrevivência e transdução de sinal. Entretanto, a este respeito, são necessários ensaios clínicos para avaliar a eficácia da terapia nos casos em que estes receptores estão ativos. Ainda, em relação a estudos in vitro, outros autores (KIM et al. 2009) mostraram a inibição da atividade de crescimento de células de câncer vulvar (A431 e SW962) por AG1478, um Inibidor da ação de Tirosina-Cinase (TKI) de EGFR, dependendo do nível de expressão deste receptor. O efeito do inibidor em combinação com cisplatina foi avaliado, mas nenhum efeito sinérgico desta combinação foi observado.

A literatura tem sugerido que TKI anti-EGFR podem ser eficazes tanto no tratamento de câncer vulvar localmente avançado em que a abordagem cirúrgica primária é frequentemente associada com alta morbidade e mortalidade (OLAWAIYE et al. 2007), quanto na combinação à terapia com a cisplatina, como mostrado por RICHARD et al. (2008) em um relato de caso em que se obteve uma resposta parcial de 5 meses, com palição dos sintomas em uma paciente com carcinoma vulvar recorrente e metastático.

O interesse médico em relação ao carcinoma de vulva tem aumentado na última década, como o reconhecimento da incidência crescente da doença, especialmente em mulheres jovens. No entanto, o fato deste carcinoma ser uma doença neoplásica incomum faz com que sua relativa raridade se torne um obstáculo na concepção de estudos para delinear a eficácia dos fatores de prognóstico de marcadores moleculares para este tipo de tumor.

Nossos dados corroboram aqueles previamente descritos na literatura de que mais estudos são necessários para estabelecer um verdadeiro potencial prognóstico destes marcadores no carcinoma vulvar, e que a hiperexpressão de HER-2 e EGFR, embora raras, possa vir a beneficiar, no futuro, um pequeno grupo específico de pacientes em neoplasias vulvares.

6.3.2 c-KIT

De acordo com a literatura, o receptor tirosina-cinase codificado pelo proto-oncogene c-KIT parece possuir papel importante na carcinogênese de vários tumores, incluindo tumor estromal gastrointestinal (GIST), melanomas, seminomas, glioblastomas, tumor de mama e leucemia mielóide

aguda (AML) (HINES et al. 1995; HEINRICH et al. 2002). De forma importante, o sistema c-KIT/SCF parece ser importante na carcinogênese do trato genital feminino. No entanto, na maior parte dos tumores, é relatada uma diminuição progressiva da expressão deste receptor à medida que o tumor cresce e invade (INOUE et al. 1994; HUANG et al. 1996), sendo ele positivo em tecidos normais e com expressão diminuída em células tumorais, o que não foi observado em nossa casuística, na qual houve uma alta expressão de c-KIT (74% de positividade).

Esta alta expressão do receptor c-KIT, constatada em nossos achados, foi descrita de modo semelhante por EROĞLU et al. (2008), que descreveram uma alta expressão forte e difusa da proteína no citoplasma e/ou membrana das células tumorais de sarcoma epitelióide vulvar. HINES et al. (1995) demonstraram uma detecção de expressão de mRNA de c-KIT em 80% dos casos de câncer de mama avaliados no estudo.

O achado freqüente de marcação imunoistoquímica citoplasmática dentre nossos casos sugere uma internalização do receptor após a sua ligação com SCF, o que indica uma regulação fisiológica da função deste receptor nas células, resultado de um rápido *turnover* da proteína que deixa de se localizar na membrana (JAHN et al. 2002; KRAMS et al. 2004). Estudos em células hematopoéticas mostraram que, na presença de SCF, a degradação de c-KIT é aumentada.

Como mostrado anteriormente na seção de resultados, observou-se melhor sobrevida global e sobrevida livre de recidiva (com significância estatística marginal) das pacientes com expressão deste receptor. Esta

constatação foi também mostrada por outros autores que encontraram resultados semelhantes em neuroblastomas (KRAMS et al. 2004), carcinomas nasofaríngeos (BAR-SELA et al. 2005) e mieloma múltiplo (BATAILLE et al. 2008). Dentre outros achados, estes autores descrevem que a expressão de c-KIT caracteriza subtipos tumorais de melhor prognóstico, achado caracterizado por eles como “não esperado” visto que, em vários tipos tumorais, c-KIT está associado com malignidade (KRAMS et al. 2004), como resultado da atividade tirosina-cinase constitutivamente ativada ou, no caso da expressão tanto de c-KIT quanto de seu ligante SCF, como resultado de uma auto-sustentação autócrina do crescimento tumoral (DIPAOLA et al. 1997; KRAMS et al. 2004). BATAILLE et al. (2008) descrevem uma sobrevida de 93% em 4 anos para pacientes com mieloma múltiplo c-KIT positivo versus 64% para as c-KIT negativo. De forma semelhante, nossos dados mostram sobrevida global de 72% para pacientes com c-KIT positivo e 50% para c-KIT negativo.

O fato de c-KIT exercer funções divergentes dependendo da modulação realizada pelos fatores do meio, das suas interações diferenciadas com várias vias efetoras intracelular e do *splicing* alternativo de seu mRNA, parece permitir efeitos opostos de sua expressão nos diferentes tumores (CARUANA et al. 1999; KAPUR et al. 2001; KRAMS et al. 2004).

Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* em células de melanoma que a exposição das células positivas para c-KIT ao SCF é capaz de desencadear apoptose, o que não ocorre na exposição de células negativas para c-KIT ou

em melanócitos normais. Uma vez que SCF é normalmente produzido por ceratinócitos e outras células da derme, estes resultados sugerem que a perda da expressão de c-KIT pode permitir que as células malignas de melanoma escapem da apoptose mediada por c-KIT/SCF, contribuindo para o crescimento tumoral e metástase (HUANG et al. 1996) e c-KIT é, desta forma, negativamente selecionado no curso da progressão tumoral (Natali et al. 1992; KRAMS et al. 2004).

Em nossa casuística, houve uma tendência de associação da marcação positiva de c-KIT e ausência de lesões associadas, além de maior sobrevida câncer específica, com diminuição do risco relativo quando a expressão era positiva, o que pode indicar uma tendência de melhor prognóstico deste marcador. Deste modo, a alta frequência de marcação positiva e difusa para c-KIT em carcinomas de vulva relacionada ao seu aparente melhor prognóstico neste tumor sugere que c-KIT não parece ser a via preferencial de ativação oncogênica em carcinomas de vulva. Entretanto, a hiperexpressão deste receptor pode ter um papel importante no tratamento deste tipo de tumor, através do uso de inibidores da atividade tirosina-cinase de c-KIT - o Imatinib - de forma semelhante como já utilizado em GISTs. Sendo assim, o aumento do conhecimento no que diz respeito aos mecanismos moleculares da sinalização de c-KIT no câncer de vulva pode ter papel importante no desenvolvimento de terapias alvo com o objetivo de inibir as vias de sinalização desencadeadas por este receptor, cuja terapia-alvo pode ser eficaz para os tumores c-KIT positivos.

6.3.3 Família MYC

No que diz respeito à avaliação imunoistoquímica de ambos os membros da família MYC, pode-se constatar a escassez da literatura a respeito desta avaliação no carcinoma de vulva. O único trabalho neste tipo de tumor no qual a expressão protéica por IIQ foi acessada, refere-se a c-MYC e data de 1992 (TERVAHAUTA et al. 1992), no qual foi observado positividade da proteína em duas de 10 amostras avaliadas. Nosso estudo mostrou positividade de c-MYC em proporção maior do que a relatada pelo estudo anterior, sendo que esta discrepância pode ser devida, principalmente, ao pequeno número de amostras utilizado no mesmo quando comparado ao nosso estudo. A escassez de trabalhos avaliando a IIQ em c-MYC dedicados ao carcinoma de vulva faz necessária a comparação dos nossos achados com relatos em outros tumores. LIU et al. (2008) descrevem 56% de positividade de c-MYC em sarcomas do trato genital feminino (incluindo vagina, cérvix, útero e ovário). Já em carcinomas de mama, a positividade desta proteína varia de 50 a 100% (SPAVENTI et al. 1994; PIETILÄINEN et al. 1995; LIAO e DICKSON 2000). Em relação a este tipo de tumor, alguns autores (PIETILÄINEN et al. 1995) relataram 95% de marcação positiva no citoplasma e em 12% houve marcação nuclear e/ou citoplasmática. Outras investigações (MIZUKAMI et al. 1991) também reportam a localização citoplasmática predominante de c-MYC, com observação de marcação nuclear em alguns casos, de modo semelhante aos nossos achados. Entretanto, o significado desta localização citoplasmática ainda é desconhecido. GEISLER et al. (2004) relataram que

pacientes cujos tumores mostraram marcação citoplasmática sem marcação nuclear mostraram melhor sobrevida que as outras combinações de marcação (negativo vs positivo/ citoplasma vs núcleo) em carcinomas de ovário. Entretanto, nossos resultados não mostraram significância estatística em relação a este aspecto.

De volta ao único estudo relatado em carcinoma vulvar (TERVAHAUTA et al. 1992), os autores descrevem que 5 dos 10 casos avaliados mostraram hiperexpressão de mRNA de c-MYC, o que pode indicar que o gene c-MYC pode estar adequadamente transcrito em mRNA, mas este último pode não estar sendo traduzido corretamente em oncoproteína. É interessante a observação dos autores a respeito da provável não tradução do mRNA em proteína, o que pode ser inferido, do mesmo modo, entre nossas análises de FISH: dentre os casos em que não foram detectadas alterações gênicas em c-MYC, 81% não apresentavam a proteína, o que pode refletir de uma fina regulação desta proteína a nível celular. Esta regulação é consistente com os papéis críticos da família MYC em controlar a proliferação e o destino celular durante o desenvolvimento, além de seu potencial oncogênico bem conhecido quando desregulada. Deste modo, vários mecanismos regulatórios foram criados para controlar finamente seus níveis e atividades, sendo a degradação rápida das proteínas MYC pela via ubiquitina-proteassomo um dos mecanismos conhecidos por contribuir para a manutenção de níveis fisiologicamente apropriados destas proteínas (KAPELI e HURLIN 2011). Por outro lado, em 82% dos casos nos quais foram encontradas alterações gênicas, a proteína

c-MYC não foi detectada, o que parece indicar a existência de uma proteína alterada, truncada, que passa a não ser reconhecida pelo anticorpo na imunistoquímica ou a real ausência de tradução protéica decorrente da presença de mecanismos como a metilação aberrante e a presença de microRNAs, envolvidos na regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional.

Em câncer de mama, apesar de muitos estudos encontrarem uma correlação entre o nível protéico de c-MYC aumentado com pior prognóstico da doença (GUÉRIN et al. 1988; PERTSCHUK et al. 1993; MIMORI et al. 1998), outros autores (PIETILÄINEN et al. 1995; BIÈCHE et al. 1999) encontraram que o aumento da expressão protéica de c-MYC estava relacionado a uma melhor sobrevida das pacientes. Achados similares foram descritos em tumores de testículo (WATSON et al. 1986), câncer colorretal (SMITH e GOH 1996) e melanoma uveal (CHANA et al. 1998). Em nossa casuística, foi observada uma associação positiva entre a expressão de c-MYC e a profundidade de invasão do tumor ($p=0,03$): tumores c-MYC positivos apresentaram maior grau de invasão que os tumores c-MYC negativos. Já foi previamente relatado na literatura que a diminuição da expressão de c-MYC *in vitro* foi capaz de inibir a invasão de células de carcinomas de ducto biliar (LI et al. 2011a). Outros autores descrevem que esta proteína estimula a invasão celular através da inibição da função de uma molécula chamada FBX8, uma E3 ligase que medeia a ubiquitinação de ARF6 (família das proteínas GTP-ligantes) que, por sua vez, regula a remodelação do citoesqueleto, podendo afetar o potencial invasivo das

células tumorais (CHO et al. 2010). Sendo assim, nossos dados sugerem que a expressão de c-MYC pode ser uma importante ferramenta relacionada à invasão tumoral em carcinomas de vulva. Entretanto, dentre as outras características clínicas e anatomo-patológicas e análises de sobrevida, não foi observada significância quando associadas à expressão de c-MYC.

Finalmente, em relação à expressão de c-MYC e recorrência, nossos resultados permitem inferir, apesar da falta de significância, que houve uma tendência de associação da expressão deste oncogene com pior sobrevida livre de doença das pacientes, indicando que sua expressão pode estar implicada na presença de recidivas. Desta forma, a investigação da expressão deste marcador no citoplasma pode vir a ser útil para identificar grupos de pacientes com risco aumentado de recorrência em carcinomas de vulva. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar questões fundamentais ainda não respondidas acerca deste oncogene de funções variadas e complexas, bem como de sua atuação nos carcinomas vulvares.

O segundo oncogene da família MYC avaliado, n-MYC, foi negativo por imunohistoquímica (escores 0 e 1+) em cerca de 70% dos casos na avaliação citoplasmática. Como mencionado anteriormente, na seção de materiais e métodos, pela indisponibilidade de material congelado para a análise da expressão desta proteína nuclear de meia-vida curta, foi realizada a análise de marcação de n-MYC no citoplasma. É sabido na literatura que a meia-vida de n-MYC pode ser prolongada na presença de sinais de degradação alterados, levando a um aumento de sua estabilidade na célula (COHN et al. 1990; BONVINI et al. 1998). Além disso, a alteração da

localização de n-MYC do núcleo para o citoplasma já foi relatada na literatura e parece indicar uma nova característica de regulação destas proteínas, além de sugerir funções de maturação em citoplasma de células neuronais (WAKAMATSU et al. 1993). De modo semelhante a c-MYC, a escassez da literatura a respeito da expressão deste oncogene em carcinomas vulvares torna limitada a discussão da expressão destas moléculas. É sabido que, enquanto c-MYC é ubíquo, n-MYC possui um padrão de expressão bastante restrito: é bastante expresso durante o desenvolvimento embriogênico e torna-se diminuído, sendo detectado em adultos no desenvolvimento de células B. Em tumores, cerca de 30% dos neuroblastomas mostram amplificação/hiperexpressão de n-MYC, o que parece estar associado a uma rápida progressão da doença e prognóstico ruim, sendo as taxas de sobrevida para pacientes n-MYC(-) significativamente maiores do que para pacientes n-MYC(+) (NAKADA et al. 1993; SUITA et al. 2000; PESSION e TONELLI 2005). Esta melhor sobrevida observada pode ser devida ao fato de que, na maior parte dos tumores, em resposta a sinais oncogênicos, p53 atua como supressor de tumor promovendo a apoptose, e foi demonstrado em neuroblastomas que altos níveis de n-MYC induzem este supressor (LI et al. 2011b). Desta forma, quanto maior a expressão de n-MYC, maior seria o *stress* gerado na célula, acarretando a apoptose, o que levaria a um tumor menos agressivo.

Hiperexpressão deste marcador também já foi relatada em tumores de ovário (33% de positividade na IIQ em adenomas, 77% em adenocarcinomas e 100% em sarcomas (KATAOKA et al. 1992), além de

retinoblastomas, carcinomas de pulmão de pequenas células e glioblastomas (PESSION e TONELLI 2005). Em carcinomas de vulva, nossos resultados não nos permitiram estabelecer quaisquer associações entre a expressão de n-MYC e os dados anatomo-patológicos, clínicos e sobrevida, o que nos leva a inferir que a proteína n-MYC funcional, como anteriormente discutido, por sua rápida degradação pode não ter sido reconhecida na imunistoquímica, sendo que a proteína visualizada acumulada no citoplasma pode ser uma proteína mutada, não funcional, com meia-vida aumentada e que conserva sítios de ligação ao anticorpo da imunistoquímica, tendo sido, desta forma, reconhecida, mas sem qualquer correlação com os dados avaliados. Dentre os casos com alterações gênicas no FISH, 78% foram correlacionados com a presença da proteína, o que pode significar que existe a transcrição de mRNA do gene n-MYC e a tradução em proteína n-MYC mas que, por sua vez, não exerce sua função como oncogene.

KAWAGOE et al. (2007) demonstraram, através de experimentos usando retrovírus codificando mutantes do gene n-MYC com regiões de domínio de transativação NH2 terminal, ou sinal de localização nuclear (SLN), ou domínio bHLH/LZ deletadas que, apesar do nível de expressão de n-MYC dos mutantes terem sido semelhantes aos selvagens, os vírus mutantes não eram capazes de estimular a proliferação celular ou aumentar a porcentagem de células da fase S ou G₂-M. Isto sugere que cada um dos domínios de n-MYC é essencial para a proliferação celular, o que fortalece a hipótese criada.

6.3.4 NDRG-1

A última molécula avaliada, NDRG-1 (*n-MYC downstream regulated gene*), apesar de não ser um oncogene, como o nome já diz, é regulada por n-MYC, que por sua vez foi estudado no presente projeto e é uma proteína que apresenta várias localizações celulares (LACHAT et al. 2002; BANDYOPADHYAY et al. 2004; NISHIO et al. 2008), bem como várias funções ainda não conhecidas (KITOWSKA e PAWEŁCZYK 2010). Em nossa casuística, esta diversidade de marcação imunoistoquímica nos compartimentos celulares foi avaliada e a maior parte dos casos mostrou hiperexpressão desta proteína (60,43% dos casos escore 3+). Esta alta expressão pode ter sido obtida pelo fato de que NDRG-1 é um gene associado à hipóxia, estando sua expressão aumentada em tumores, que possuem ambiente pobre em oxigênio e nutrientes (CANGUL et al. 2002; KITOWSKA e PAWEŁCZYK 2010). Expressão aumentada de NDRG-1 foi relatada em carcinomas de células escamosas de pele e oral em relação ao tecido normal (CHANG et al. 2005; DANG et al. 2006), carcinoma hepatocelular (CHUA et al. 2007) e tumor renal (MASUDA et al. 2007) sendo que, em câncer cervical, esta alta expressão foi correlacionada inversamente com sobrevida global das pacientes (NISHIO et al. 2008). Entretanto, em tumores de cólon (GUAN et al. 2000), próstata e mama (BANDYOPADHYAY et al. 2003), esôfago (ANDO et al. 2006) e glioma (SUN et al. 2009), a expressão de mRNA e protéica de NDRG-1 mostraram-se diminuídas no tumor, paradoxo que indica que esta proteína possui funções tecido-específicas em vários tipos de neoplasias. Além disso, fatores hormonais,

nível de hipóxia e modificações genéticas e/ou epigenéticas em supressores de tumor (ex. p53) e oncogenes (ex. MYC) podem exercer impacto na expressão de NDRG-1 e modular seu papel em diferentes tumores (MELOTTE et al. 2010).

Algumas das características avaliadas em relação à expressão de NDRG-1 mostraram que uma hiperexpressão pode ser indicativa de um pior prognóstico em carcinomas de vulva: dentre os casos classificados como 3+, 87% mostraram invasão vascular, 100% invasão perineural, não sendo esta característica observada em casos escores 0 e 1+, e 80% apresentaram recidiva. Entretanto, não houve a possibilidade de testes estatísticos nestas amostras pela distribuição homogênea de amostras entre os grupos 2+ e 3+. Vários estudos avaliaram o uso de NDRG-1 como um marcador prognóstico em gliomas (SUN et al. 2009), mama (RING et al. 2006) e câncer colorretal (STRZELCZYK et al. 2009) e os resultados do nosso trabalho indicam um possível papel deste marcador em carcinomas de vulva. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados de modo a elucidar este pior prognóstico, visto que sua expressão depende de processos complexos ainda não bem estabelecidos.

Em relação à localização celular de NDRG-1, vários autores relataram que ela é comumente encontrada no citoplasma (LACHAT et al. 2002; MELOTTE et al. 2010), mas já foi documentado na literatura que a translocação de NDRG-1 para o núcleo celular ocorre de modo dependente de p53 após dano ao DNA (KURDISTANI et al. 1998). Em câncer gástrico, esta expressão de NDRG-1 nuclear foi correlacionada com pior prognóstico

dos pacientes, sugerindo que esta translocação leva a um aumento do potencial de divisão celular (INAGAKI et al. 2009). Entretanto, dentre os nossos casos avaliados não houve significância estatística entre as sobrevidas de pacientes que expressaram ou não NDRG-1 no núcleo.

NDRG-1 também já foi relatada encontrada na membrana celular (BANDYOPADHYAY et al. 2004; NISHIO et al. 2008), e foi observada uma relação entre o nível protéico desta proteína e o potencial das células tumorais à metástase, o que sugere que ela pode interagir com moléculas de adesão célula-célula. SONG et al. (2010) descreveram uma correlação significativa entre a localização celular de NDRG1 e E-caderina, tendo observado que a diminuição do conteúdo de ambas as proteínas na membrana de células de câncer de próstata mostrou um impacto negativo na sobrevida dos pacientes e foi correlacionada com estágios mais avançados da doença (score de Gleason). Deste modo, a translocação de NDRG-1 da membrana para o citoplasma sugere uma importância para a progressão do câncer de próstata e deve ser melhor avaliada em carcinomas de vulva.

Em suma, NDRG-1 parece ser uma proteína cuja expressão depende de fatores predominantes em condições particulares. Nosso estudo indica que os níveis aumentados de NDRG-1 podem estar correlacionados com um pior prognóstico, mas a confirmação dos possíveis papéis deste gene ainda requer maiores estudos.

6.4 HPV

A detecção do HPV dentre os casos de carcinoma vulvar avaliados neste projeto – cerca de 40% de positividade – é muito semelhante aos resultados apontados por uma metanálise que investigou a presença de HPV em neoplasias de vulva, vagina e ânus, além de suas lesões precursoras (VIN, VAIN e AIN, respectivamente) provenientes de estudos com ensaios de PCR realizados em 93 estudos conduzidos em quatro continentes. A prevalência geral de HPV dentre os 1873 tumores de vulva avaliados por este estudo foi de 40,4% (DE VUYST et al. 2009). Dentre os tipos infectantes, o HPV16 foi o mais comum, representando 34,62% dos tumores HPV positivos, bastante semelhante ao dado DE VUYST et al. (2009) que observou frequência de 32,2% deste tipo de vírus em carcinomas de vulva.

Dentre os tumores em que foi detectada infecção pelo HPV, a maior parte pertenceu aos tipos histológicos não ceratinizantes tipo CEC2 (42%). Entretanto, dentre os 18 casos com diagnóstico de CEC3 ou carcinoma basalóide, 13 eram HPV positivos. Este último dado corrobora os resultados da literatura de que tumores HPV positivos tendem a pertencer aos tipos não ceratinizantes e basalóides (HAMPL et al. 2006; GARLAND et al. 2009). Já no grupo de tumores HPV negativo, foram mais freqüentes os carcinomas moderadamente diferenciados (52%) seguido dos bem diferenciados (CEC 1 e verrucoso – 40%), resultado também semelhante aos dados mostrados na literatura (HORDING et al. 1994; MESSING e GALLUP 1995; TRIMBLE et al. 1996; JONES et al. 1997; HAMPL et al. 2006). No primeiro grupo, a via

etiopatogênica do tumor é dependente da infecção pelo HPV, na qual um estágio pré-maligno é observado através de presença de VINs clássicas, geralmente associada com idade mais jovem das pacientes e tem sido relatada como tendo um melhor prognóstico em relação aos tumores do grupo HPV-negativo; já no segundo grupo, via é caracterizada por tumores HPV-negativos, acometendo em sua maioria mulheres mais velhas e é, geralmente, acompanhada de lesões (VINs) diferenciadas ou líquen escleroso e mutações em p53 (VAN DER AVOORT et al. 2006; HAMPL et al. 2006; LANNEAU et al. 2009).

Dentre a nossa casuística, mulheres com a infecção por HPV demonstraram uma média de idade e de coitarca menores em relação aquelas sem a infecção, corroborando dados previamente descritos na literatura. Entretanto, pelo agrupamento homogêneo das pacientes entre as distribuições das características de interesse, não houve diferença estatisticamente significativa de quaisquer dados com a infecção do HPV, bem como em relação à sobrevida; no entanto, houve uma tendência de pior sobrevida câncer específica das pacientes HPV negativas em relação às que tinham infecção pelo vírus.

Finalmente, dentre os oncogenes avaliados e NDRG-1, não houve correlação estatística entre a presença viral e a expressão destes genes, com exceção da relação de nível de significância estatístico marginal demonstrada entre a expressão positiva de c-KIT e a presença de HPV ($p=0,08$). Nenhum dado na literatura sugere qualquer relação entre este oncogene e o vírus, o que nos leva a criar a hipótese de que o *locus* de c-

KIT pode ser um sítio frágil ainda desconhecido da integração do HPV ou que anormalidades na regulação deste gene podem estar acelerando o processo da carcinogênese em cooperação com a infecção viral.

Grande parte dos trabalhos referidos na literatura em oncogenes e HPV em carcinoma de vulva refere-se a alterações nos genes MYC e mostram dados provenientes de integração de sequências gênicas do vírus HPV nos *loci* gênicos de ambos os genes c-MYC e n-MYC (8q24 e 2p24, respectivamente). Entretanto, o impacto do evento de integração na amplificação, rearranjo e/ou hiperexpressão gênica ainda são pouco documentados.

Dentre nossos os resultados obtidos em relação à expressão de genes MYC e interação com HPV, a falta de correlação entre os dois parâmetros nos permite inferir que: (1) tumores HPV negativos podem apresentar alterações em MYC de modo independente da presença/ausência de infecção, por serem, principalmente c-MYC, genes amplamente alterados em tumores. É sabido que amplificação e expressão protéica aumentada de c-MYC, em particular, podem ocorrer independentemente da integração viral, como demonstrado em células de Linfoma de Burkitt associado com o vírus de Epstein-Barr (MAGRATH 1990) e em hepatocarcinomas induzidos por *ground squirrel hepatitis virus* (GSHV), causador de hepatite em esquilos; (2) apesar da maior parte dos tumores HPV positivos conterem o DNA viral em forma integrada ao genoma do hospedeiro, a presença de DNA epissomal ou em ambas as formas epissomal e integrada já foi descrita em carcinomas cervicais (CULLEN et al.

1991; KISSELJOV et al. 2001). Sendo assim, tumores que apresentam HPV podem não tê-lo na forma integrada e não apresentarem aumento de expressão de MYC; (3) além de c-MYC e n-MYC, vários sítios de integração de sequências de HPV já foram descritas (CANNIZZARO et al.1988; REUTER et al. 1998; KOOPMAN et al. 1999). Deste modo, ainda que um tumor seja HPV positivo e ainda que ele contenha DNA viral integrado ao genoma, alterações em MYC podem não ser observadas. Além disso, alterações em MYC podem estar presentes ainda na ausência de integração viral pelo fato de que sua expressão desregulada é um *status* quase onipresente em tumores (DANOVI 2010). Todos estes achados corroboram os descritos por TATE et al. (1994), indicando que alterações em MYC não parecem estar ligadas à presença ou ausência de ácidos nucléicos de HPV em carcinoma de vulva.

CONCLUSÃO

*“Every experiment proves something. If it doesn't prove what you wanted it to prove,
it proves something else”.*

Prof. Anon

7 CONCLUSÃO

A partir do estudo imunoistoquímico e por FISH dos oncogenes abordados e da comparação dos resultados obtidos com os dados clínicos e anatomo-patológicos das pacientes, nosso trabalho nos permitiu concluir que:

Em relação à HER-2 e EGFR, uma rara expressão foi observada. EGFR foi correlacionado com estádios mais avançados da doença, ao passo que a expressão de HER-2 mostrou pior prognóstico. Correlação de FISH e IIQ de 100% foi observada para ambos os oncogenes.

A imunoexpressão de c-MYC foi correlacionada com maior potencial invasor tumoral, mas nenhuma associação com HPV foi observada. Não houve qualquer associação entre as características avaliadas e a expressão de n-MYC.

A expressão de c-KIT mostrou, de modo estatisticamente marginal, tendência de melhor prognóstico e ausência de lesões associadas.

Relacionado à NDGR-1, sua expressão, com papel controverso na literatura, mostrou tendência de pior prognóstico nos carcinomas vulvares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer reference information**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org>> [2011 may 17].

Andersen BL, Hacker NF. Psychosexual adjustment after vulvar surgery. **Obstet Gynecol** 1983; 62:457–62.

Ando T, Ishiguro H, Kimura M, et al. Decreased expression of NDRG1 is correlated with tumor progression and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Dis Esophagus** 2006; 19:454-8.

Andreasson B, Bock J, Visfeldt J. Prognostic role of histology in squamous cell carcinoma in the vulvar region. **Gynecol Oncol** 1982; 14:373-81.

Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. **EMBO J** 2006; 25:3234-44.

Bandyopadhyay S, Pai S, Hirota S, et al. PTEN up-regulates the tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in prostate and breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:7655-60.

Bar-Sela G, Ben Arush MW, Sabo E, Kuten A, Minkov I, Ben-Izhak O. Pediatric nasopharyngeal carcinoma: better prognosis and increased c-Kit expression as compared to adults. **Pediatr Blood Cancer** 2005; 45:291-7.

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.

Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P. CD117 (c-KIT) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. **Leuk Res** 2008; 32:379-82.

Benedet JL. Câncer ginecológico: câncer de vulva. In: Pollock RE, Doroshow JH, Khayat D, Nakao A, O'Sullivan B, editores. **Manual de oncologia clínica da UICC**. 8ª ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo; 2008. p.565-70.

Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC Jr. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina. **Obstet Gynecol** 1990; 76:381-7.

Bièche I, Laurendeau I, Tozlu S, et al. Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. **Cancer Res** 1999; 59:2759-65.

Bonvini P, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. In vivo degradation of N-myc in neuroblastoma cells is mediated by the 26S proteasome. **Oncogene** 1998; 16:1131-9.

Boon K, Caron HN, van Asperen R, et al. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. **EMBO J** 2001; 20:1383-93.

Brandenberger AW, Rudlinger R, Hanggi W, Bersinger NA, Dreher E. Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma: a study by in situ hybridisation. **Arch Gynecol Obstet** 1992; 252:31-5.

Brustmann H. Epidermal growth factor receptor is involved in the development of an invasive phenotype in vulvar squamous lesions, but is not related to MIB-1 immunoreactivity. **Int J Gynecol Pathol** 2007; 26:481-9.

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

Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. **BMC Genet** 2004; 5:27.

Cannizzaro L, Dürst M, Mendez MJ, Hecht BK, Hecht F. Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. **Cancer Genet Cytogenet** 1988; 33:93-8.

Caruana G, Cambareri AC, Ashman LK. Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. **Oncogene** 1999; 18:5573-81.

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

Chana JS, Cree IA, Foss AJ, Hungerford JL, Wilson GD. The prognostic significance of c-myc oncogene expression in uveal melanoma. **Melanoma Res** 1998; 8:139-44.

Chang JT, Wang HM, Chang KW, et al. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and underexpression of CHES1. **Int J Cancer** 2005; 114:942-9.

Cho HJ, Oh YJ, Kwon J, et al. c-Myc stimulates cell invasion by inhibiting FBX8 function. **Mol Cells** 2010; 30:355-62.

Chua MS, Sun H, Cheung ST, et al. Overexpression of NDRG1 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Mod Pathol** 2007; 20:76-83.

Cohn SL, Salwen H, Quasney MW, et al. Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. **Oncogene** 1990; 5:1821-7.

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

Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. **J Virol** 1991; 65:4534-8.

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

Cullen AP, Reid R, Champion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **J Virol** 1991; 65:606-12.

Dang CV. C-MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Mol Cell Biol** 1999; 19:1-11.

Dang C, Gottschling M, Manning K, et al. Identification of dysregulated genes in cutaneous squamous cell carcinoma. **Oncol Rep** 2006; 16:513-9.

Danovi SA. Tumorigenesis: might as well face it, you're addicted to MYC. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:532-3.

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 Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **Int J Cancer** 2009; 124:1626-36.

diPaola RS, Kuczynski WI, Onodera K, et al. Evidence for a functional kit receptor in melanoma, breast, and lung carcinoma cells. **Cancer Gene Ther** 1997; 4:176-82.

Eroğlu A, Sarı A, Eroglu N. Primary epithelioid sarcoma of the vulva in pregnancy. **Gynecol Surg** 2008; 5:61-4.

Essapen S, Thomas H, Green M, et al. The expression and prognostic significance of HER-2 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological parameters. **Int J Oncol** 2004; 24:241-8.

Faria M, Rabenhorst S. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Rev Bras Cancerol** 2006; 52:165-71.

Fonseca-Moutinho JA. Neoplasia intraepitelial vulvar: um problema atual. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2008; 30:420-6.

Fristachi CE. Câncer de vulva: algumas considerações sobre o tratamento cirúrgico [periódico online]. **Prat Hosp** 2004; 6. Disponível em: <URL<http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2032/paginas/materia%2002-32.html>> [2011 set 12]

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

[FOSP] Fundação Oncocentro de São Paulo. **Registro de câncer no Estado de São Paulo**. São Paulo: ONCENTRO; 1990.

Garland SM, Insinga RP, Sings HL, et al. Human papillomavirus infections and vulvar disease development. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:1777-84.

Geisler JP, Geisler HE, Manahan KJ, et al. Nuclear and cytoplasmic c-myc staining in endometrial carcinoma and their relationship to survival. **Int J Gynecol Cancer** 2004; 14:133-7.

Geiselhart LA, Christian T, Minnear F, Freed BM. The cigarette tar component p-benzoquinone blocks T-lymphocyte activation by inhibiting interleukin-2 production, but not CD25, ICAM-1, or LFA-1 expression. **Toxicol Appl Pharmacol** 1997; 143:30-6.

Gerhard R, Nonogaki S, Fregnani JH, Soares FA, Nagai MA. NDRG1 protein overexpression in malignant thyroid neoplasms. **Clinics (São Paulo)** 2010; 65:757-62.

Gilcrease MZ, Woodward WA, Nicolas MM, et al. Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:759-67.

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

Gordinier ME, Steinhoff MM, Hogan JW, et al. S-Phase fraction, p53, and HER-2/neu status as predictors of nodal metastasis in early vulvar cancer. **Gynecol Oncol** 1997; 67:200-2.

Griffiths A, Wessler S, Lewontin R. **Introdução à genética**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

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

Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y, Shaw LM, Pardee AB. Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. **Cancer Res** 2000; 60:749-55.

Guérin M, Barrois M, Terrier MJ, Spielmann M, Riou G. Overexpression of either c-myc or c-erbB-2/neu proto-oncogenes in human breast carcinomas: correlation with poor prognosis. **Oncogene Res** 1988; 3:21-31.

Hacker NF. Vulvar cancer. In: Berek JS, Hacker NF, editors. **Practical gynecologic oncology**. 4th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2005. p.585-602.

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

Hantschmann P, Jeschke U, Friese K. TGF- α , c-erbB-2 expression and neoangiogenesis in vulvar squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2005; 25:1731-7.

Hasigawa T. Role of immunohistochemical expression of KIT/CD 117 in gastrointestinal stromal tumors. In: Hayat MA, editor. **Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas**. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006. p.135-42.

Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW. Coexpression of the c-KIT and stem cell factor genes in breast carcinomas. **Cell Growth Differ** 1995; 6:769-79.

Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. **J Clin Oncol** 2002; 20:1692-703.

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

Homesley HD, Bundy BN, Sedlis A, et al. Prognostic factors for groin node metastasis in squamous cell carcinoma of the vulva (a Gynecologic Oncology Group study). **Gynecol Oncol** 1993; 49:279-83.

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

Horiguchi S, Hishima T, Hayashi Y, et al. Her-2/neu cytoplasmic staining is correlated with neuroendocrine differentiation in breast carcinoma. **J Med Dent Sci** 2010; 57:155-63.

Huang S, Luca M, Gutman M, et al. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. **Oncogene** 1996; 13:2339-47.

Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG, 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.

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

Inagaki Y, Tang W, Xu HL, et al. Localization of N-myc downstream-regulated gene 1 in gastric cancer tissue. **Dig Liver Dis** 2009; 41:96-103.

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

Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T, Kondoh G. Coexpression of the c-KIT receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. **Cancer Res** 1994; 54:3049-53.

Jahn T, Seipel P, Coutinho S, et al. Analysing c-KIT internalization using a functional c-KIT-EGFP chimera containing the uorochrome within the extracellular domain. **Oncogene** 2002; 21:4508-20.

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

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, Breitenecker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. **J Reprod Med** 2000; 45: 613-5.

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

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Genitália externa; p.448.

Kalaydjieva L, Nikolova A, Turnev I, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy-Lom, a novel demyelinating neuropathy associated with deafness in gypsies. Clinical, electrophysiological and nerve biopsy findings. **Brain** 1998; 121(Pt 3):399-408.

Kapeli K, Hurlin PJ. Differential Regulation of N-Myc and c-Myc Synthesis, Degradation, and Transcriptional Activity by the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. **J Biol Chem** 2011; 286:38498-508.

Kapur R, Cooper R, Zhang L, Williams DA. Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways. **Blood** 2001; 97:1975-81.

Kataoka A, Nishida T, Sugiyama T, et al. Immunohistochemical studies of recessive oncogene p53 and N-myc oncogene expression in 7, 12 dimethylbenz (a) anthracene-induced rat ovarian tumors [abstract]. **Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi** 1992; 44:391-6.

Kawagoe H, Kandilci A, Kranenburg TA, Grosveld GC. Overexpression of N-Myc rapidly causes acute myeloid leukemia in mice. **Cancer Res** 2007; 67:10677-85.

Kim SH, Song YC, Kim SH, Jo H, Song YS. Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor alone and in combination with cisplatin on growth of vulvar cancer cells. **Ann N Y Acad Sci** 2009; 1171:642-8.

Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, et al. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. **Virology** 1997; 232:53-61.

Kisseljov F, Kisseljova N, Kobzeva V, et al. State of human papilloma virus DNA in cervical carcinomas. **Mol Biol** 2001; 35:399-404.

Kitowska A, Pawelczyk T. N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery. **Acta Biochim Pol** 2010; 57:15-21.

Koopman LA, Szuhai K, van Eendenburg JD, et al. Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. **Cancer Res** 1999; 59:5615-24.

Krams M, Parwaresch R, Sipos B, Heidorn K, Harms D, Rudolph P. Expression of the c-KIT receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis. **Oncogene** 2004; 23:588-95.

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

Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. **J Biol Chem** 1996; 271:29659-65.

Kovacevic Z, Richardson D. The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer. **Carcinogenesis** 2006; 27:2355-66.

Kurdistani SK, Arizti P, Reimer CL, Sugrue MM, Aaronson SA, Lee SW. Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage. **Cancer Res** 1998; 58:4439-44.

Lachat P, Shaw P, Gebhard S, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. **Histochem Cell Biol** 2002; 118:399-408.

Lambropoulou M, Stefanou D, Alexiadis G, et al. Cytoplasmic expression of c-erb-B2 in Endometrial Carcinomas **Onkologie** 2007; 30:495-500.

Kohlberger P, Kainz C, Breitenecker G et al. Prognostic value of immunohistochemically detected p53 expression in vulvar carcinoma. **Cancer** 1995; 76:1786-89

Kumar S, Shah JP, Bryant CS, Imudia AN, Morris RT, Malone JM Jr. A comparison of younger vs older women with vulvar cancer in the United States. **Am J Obstet Gynecol** 2009; 200:e52-5.

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

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

Lev S, Blechman JM, Givol D, Yarden Y. Steel factor and c-KIT protooncogene: genetic lessons in signal transduction. **Crit Rev Oncog** 1994; 5:141-68.

Li Q, Aubrey MT, Christian T, Freed BM. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. **Fundam Appl Toxicol** 1997; 38:158-65.

Li ZR, Wu YF, Ma CY, Nie SD, Mao XH, Shi YZ. Down-regulation of c-Myc expression inhibits the invasion of bile duct carcinoma cells. **Cell Biol Int** 2011a; 35:799-802.

Li T, Wang L, Ke XX, et al. DNA damaging drugs-induced apoptosis sensitized by N-myc in neuroblastoma cells. **Cell Biol Int** 2011b Sep 20. [Epub ahead of print].

Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. **Endocr Relat Cancer** 2000; 7:143-64.

Liu FS, Jan YJ, Lai CR, et al. Expression analysis of apoptosis-related markers TP53, BCL-2, BAX and c-MYC in female genital tract sarcomas. **J Chin Med Assoc** 2008; 71:628-34.

Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, et al. Requirement of c-KIT for development of intestinal pacemaker system. **Development** 1992; 116:369-75.

Madretsma GS, Donze GJ, van Dijk AP, Tak CJ, Wilson JH, Zijlstra FJ. Nicotine inhibits the in vitro production of interleukin 2 and tumour necrosis factor- α by human mononuclear cells. **Immunopharmacology** 1996; 35:47-51.

Maffini MV, Soto AM, Sonnenschein C, Papadopoulos N, Theoharides TC. Lack of c-KIT receptor promotes mammary tumors in N-nitrosomethylurea-treated Ws/Ws rats. **Cancer Cell Int** 2008; 8:5.

Magrath I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. **Adv Cancer Res** 1990; 55:133-270.

Maggard MA, O'Connell JB, Lane KE, Liu JH, Etzioni DA, Ko CY. Do young breast cancer patients have worse outcomes? **J Surg Res** 2003; 113:109-13.

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

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

Masuda K, Ono M, Okamoto M. et al. Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. **Int J Cancer** 2003; 105:803-10.

McCue JM, Link KL, Eaton SS, Freed BM. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. **J Immunol** 2000; 165:6771-5.

Melotte V, Qu X, Ongenaert M, et al. The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. **FASEB J** 2010; 24:4153-66.

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

Milde-Langosch K, Becker G, Löning T. Human papillomavirus and c-myc/c-erbB2 in uterine and vulvar lesions. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1991; 419:479-85.

Mimori K, Mori M, Shiraishi T, et al. Expression of ornithine decarboxylase mRNA and c-myc mRNA in breast tumours. **Int J Oncol**. 1998; 12:597-601.

Mizukami Y, Nonomura A, Noguchi M, et al. Immunohistochemical study of oncogene product ras p21, c-myc and growth factor EGF in breast carcinomas. **Anticancer Res** 1991; 11:1485-94.

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

Molina M, Codony-Servat J, Albanell J, et al. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. **Cancer Res** 2001; 61:4744-9.

Molina M, Saéz R, Ramsey E, et al. NH2-terminal Truncated HER-2 Protein but not Full-Length Receptor Is Associated with Nodal Metastasis in Human Breast Cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:347-53.

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

Montag A, Kumar V. O sistema genital feminino e a mama: vulva. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editores. **Robbins patologia básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.776-9.

Nakada K, Fujioka T, Kitagawa H, Takakuwa T, Yamate N. Expressions of N-myc and ras oncogene products in neuroblastoma and their correlations with prognosis. **Jpn J Clin Oncol** 1993; 23:149-55.

Nakanishi G, Fujii K, Asagoe K, Tanaka T, Iwatsuki K. Human papillomavirus genome integration in multifocal vulvar Bowen's disease and squamous cell carcinoma. **Clin Exp Dermatol** 2009; 34:e965-7.

[NCI] National Cancer Institute. **Cancer facts and figures 2005**. Washington (DC). Available from: <URL:<http://www.nci.nih.gov/cancertopics/pdq/vulvar>> [2011 jun 06].

Nicoletto MO, Parenti A, Del Bianco P, et al. Vulvar cancer: prognostic factors. **Anticancer Res** 2010; 30:2311-7.

Nilsson JA, Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. **Oncogene** 2003; 22:9007-21.

Nishio S, Ushijima K, Tsuda N, et al. Cap43/NDRG1/Drg-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. **Cancer Lett** 2008; 264:36-43.

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

Oonk MH, de Bock GH, van der Vee DJ, et al. EGFR expression is associated with groin node metastases in vulvar cancer, but does not improve their prediction. **Gynecol Oncol** 2007; 104:109-13.

Osako T, Miyahara M, Uchino S, Inomata M, Kitano S, Kobayashi M. Immunohistochemical study of c-erbB-2 protein in colorectal cancer and the correlation with patient survival. **Oncology** 1998; 55:548-55.

Parazzini F, Moroni S, Negri E, La Vecchia C, Dal Pino D, Cavalleri E. Selected food intake and risk of vulvar cancer. **Cancer** 1995; 76:2291-6.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J. **Cancer incidence in five continents**. Lyon: IARC; 1992. (IARC Scientific Publications v. 6).

Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjänen K. Expression of c-myc proteins in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. **Anticancer Res** 1995; 15:959-64.

Pietsch E, Sykes S, McMahon S et al. The p53 family and programmed cell death. **Oncogene** 2008; 27:6507–21

Pedrazzini E, Mamaev N, Yakovleva T, et al. Genomic rearrangements involving rDNA and centromeric heterochromatin in vulvar epidermoid carcinoma cell line A-431. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 143:50-8.

Pertschuk LP, Feldman JG, Kim DS, et al. Steroid hormone receptor immunohistochemistry and amplification of c-myc protooncogene. Relationship to disease-free survival in breast cancer. **Cancer** 1993; 71:162-71.

Pession A, Tonelli R. The MYCN oncogene as a specific and selective drug target for peripheral and central nervous system tumors. **Curr Cancer Drug Targets** 2005; 5:273-83.

Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene** 2006; 25:5985-93.

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

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

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

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

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

Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, et al. APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a

cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. **EMBO J** 1998; 17:215-22.

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

Ring BZ, Seitz RS, Beck R, et al. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptorpositive breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:3039-47.

Rivière A, Wilckens C, Löning T. Expression of c-erbB2 and c-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck and the lower female genital tract. **J Oral Pathol Med** 1990; 19:408-13.

Rotmensch J, Herbst A. Neoplasms of the vulva and vagina. In: Holland JF, Bast Jr RC, Morton DI, Frei III E, Kufe DW, Weichselbaum RR, editors. **Cancer medicine**. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p.2215-26.

Sachdeva M, Mo YY. p53 and c-myc: how does the cell balance “yin” and “yang”? **Cell Cycle** 2009; 8:1303.

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.

Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, et al. Clinical benefit of lapatinib-based therapy in pacientes with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95her2 receptor. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2688-95.

Scheistroen M, Trope C, Pettersen EO et al. p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the vulva. **Cancer** 1999; 85:1133–38

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

Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U. c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. **Mod Pathol** 2002; 15:462-9.

Sheiness D, Bishop JM. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. **J Virol** 1979; 31:514-21.

Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:731-7.

Sirotnak FM. Studies with ZD1839 in preclinical models. **Semin Oncol** 2003; 30(Suppl 1):12-20.

Sliutz G, Schmidt W, Tempfer C et al. Detection of p53 point mutations in primary human vulvar cancer by PCR and temperature gradient gel electrophoresis. **Gynecol Oncol** 1997; 64:93-98

Smith DR, Goh HS. Overexpression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma is associated with a reduced mortality that is abrogated by point mutation of the p53 tumor suppressor gene. **Clin Cancer Res** 1996; 2:1049-53.

Song Y, Oda Y, Hori M, et al. N-myc downstream regulated gene-1/Cap43 may play an important role in malignant progression of prostate cancer, in its close association with E-cadherin. **Hum Pathol** 2010; 41:214-22.

Spaventi R, Pavelic K, Pavelic ZP, Gluckman JL. The concomitant expression of oncogenes and growth factors in human breast cancer. **Eur J Cancer** 1994; 30A:723-4.

Sperling C, Schwartz S, Buchner T, Thiel E, Ludwig WD. Expression of the stem cell factor receptor c-KIT (CD117) in acute leukemias. **Haematologica** 1997; 82:617-21.

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.

Strzelczyk B, Szulc A, Rzepko R, et al. Identification of highrisk stage II colorectal tumors by combined analysis of the NDRG1 gene expression and the depth of tumor invasion. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:1287-94.

Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Cytoplasmic staining of erbB-2 but not mRNA levels correlates with differentiation in human thyroid neoplasia. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1998; 49:629-37.

Suita S, Tajiri T, Sera Y, et al. Improved survival for patients with advanced neuroblastoma after high-dose combined chemotherapy based in part on N-myc amplification. **J Pediatr Surg** 2000; 35:1737-41.

Sun B, Chu D, Li W, et al. Decreased expression of NDRG1 in glioma is related to tumor progression and survival of patients. **J Neurooncol** 2009; 94:213-9.

Tan J, Chetty N, Kondalsamy-Chennakesavan S et al: Applying the FIGO 2009 staging system for carcinoma of the vulva to patients previously staged with the FIGO 1988 staging system. **Gynecol Oncol** 2010; 116:S21-2.

Tate JE, Mutter GL, Prasad CJ, Berkowitz R, Goodman H, Crum CP. Analysis of HPV-positive and -negative vulvar carcinomas for alterations in c-myc, Ha-, Ki-, and N-ras genes. **Gynecol Oncol** 1994; 53:78-83.

Tervahauta AI, Syrjänen SM, Kallio PJ, Syrjänen KJ. Immunohistochemistry, in situ hybridization and polymerase chain reaction (PCR) in detecting c-myc expression in human malignancies. **Anticancer Res** 1992; 12:1005-11.

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

Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, et al. Preferential localization of c-KIT product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Virchows Arch** 1994; 424:135-41.

van Belzen N, Dinjens WN, Eussen BH, Bosman FT. Expression of differentiation-related genes in colorectal cancer: possible implications for prognosis. **Histol Histopathol** 1998; 13:1233-42.

van der Avoort IA, 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.

Wakamatsu Y, Watanabe Y, Shimono A, Kondoh H. Transition of localization of the N-Myc protein from nucleus to cytoplasm in differentiating neurons. **Neuron** 1993; 10:1-9.

Wang Z, Wang F, Wang WQ, et al. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. **World J Gastroenterol** 2004; 10:550-4.

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

Watson JV, Stewart J, Evan GI, Ritson A, Sikora K. The clinical significance of flow cytometric c-myc oncoprotein quantitation in testicular cancer. **Br J Cancer** 1986; 53:331-7.

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.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:118-45.

Wu X, Xin Y, Yao J, et al. Expression of epithelial growth factor receptor and its two ligands, transforming growth factor-alpha and epithelial growth factor,

in normal and neoplastic squamous cells in the vulva: an immunohistochemical study. **Med Electron Microsc** 2001; 34:179-84.

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

Zhou H, Randall RL, Brothman AR, Maxwell T, Coffin CM, Goldsby RE. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. **J Pediatr Hematol Oncol** 2003; 25:27-32.

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

ANEXOS

"Reason, Observation, and Experience - the Holy Trinity of Science".

Robert G. Ingersoll

Anexo 1 - Revisão atualizada da literatura dos oncogenes selecionados no estudo e NDRG-1 em carcinomas de vulva

	Autores, ano e país de publicação	Número de pacientes	Métodos, desenho do estudo e análises estatísticas	Resultados	Conclusões
HER-2	<i>Hantschsmann et al., 2005, Alemanha</i>	75 amostras VSCC	Os autores realizaram IIQ para avaliar a expressão de TGF- α , HER-2 e Antígeno Fator VIII. An. Estat.: teste X^2 , Kaplan-Meier e log rank test.	Hiperexpressão de HER-2 na membrana foi presente em 47% (++) e 21% (+++) dos tumores. Houve uma freqüente marcação citoplasmática forte nos casos avaliados. Hiperexpressão de HER-2 foi correlacionada com alta contagem de figuras de mitose e tumores de alto grau.	Os autores refletem que, uma vez que existe um importante papel preditivo do HER-2 em relação à terapia com trastuzumab, o uso desta substância em carcinomas de vulva deve ser considerado.
	<i>Gordinier et al., 1997, Estados Unidos.</i>	100 pacientes com VSCC	Studo de coorte. Autores usaram IIQ e citometria de fluxo para analisar tumores de 13 pacientes LN positivos e 26 controles. An. Estat.: Não especificada.	A presença de imunopositividade de HER-2 foi associada com metástase linfonodal.	Pacientes com tumores de vulva iniciais com metástase linfonodal inguinal tiveram maior imunopositividade para HER-2 quando comparados com aqueles sem metástase linfonodal.
	<i>Berchuck et al., 1990, Estados Unidos.</i>	34 amostras tumorais (26 cérvix, 6 VSCC e 2 de vagina) + tecido não neoplásico, incluindo vulvas normais.	Expressões de EGFR e HER-2 foram avaliadas por IIQ. An. Estat.: Não especificada.	Expressão imunoistoquímica para EGFR e HER-2 mostrou-se diminuída à medida que as células sofriam diferenciação, estando ausentes nas camadas mais adjacentes.	Apesar da hiperexpressão de HER-2 em carcinomas escamosos do trato genital ser um evento raro, ela pode estar associada a um comportamento biológico mais agressivo.
	<i>Fukutome et al., 2006, Japão</i>	Linhagem celular de VSCC de vulva (A431)	Cultura celular de vulva foi irradiada e tratada com ZD1839 (0.1 μ M) e/ou Trastuzumab (50 μ g/ml). Western Blot e citometria de fluxo foram realizados. An. Estat.: teste <i>t</i> para medir a diferença entre os grupos.	Crescimento celular foi diminuído por ZD1839 e/ou trastuzumab de modos dependentes de dose e tempo. O tratamento com trastuzumab induziu um aumento significativo na população celular em fase G1.	Os autores sugerem que o bloqueio simultâneo de diferentes sítios da família ERBB, podendo ter papel importante nos tumores onde HER-2 e EGFR estão ativados.
EGFR	<i>Johnson et al., 1997, Estados Unidos.</i>	61 pacientes	61 amostras de epitélio vulvar benigno + lesão maligna primária + metástase linfonodal (todas da mesma paciente) foram avaliadas por IIQ para EGFR. An. Estat. Kaplan-Meier para as sobrevidas.	Foi observado aumento significativo dos níveis de EGFR no tumor primário (67%) versus epitélio benigno (31%). Expressão em 90% ou mais das células tumorais foi associada com sobrevida livre de doença de 25%, enquanto naquelas com menos de 90% de expressão, a sobrevida foi de 54%.	Existe um aumento progressivo da expressão de EGFR relacionado à tumorigênese e metástase.

<i>Growdon et al., 2008, Estados Unidos.</i>	51 pacientes	Estudo coorte. Análise de EGFR por IIQ, FISH, análise de mutações e tipagem de HPV por PCR. An. Estat.: Two-sided Fisher's exact test, teste de Spearman, Kaplan-Meier e Log-rank.	Marcação IIQ 3+ foi associada com estágio avançado da doença e pior sobrevida. Amplificação do gene EGFR foi observada em 12% dos casos e polissomia em 6%. IIQ x FISH mostrou 100% de sensibilidade e 79% de especificidade, gerando um valor preditivo positivo de 39%. Sobrevida diminuída foi mostrada em pacientes com amplificação.	Os autores sugerem que uma proporção pequena, mas significantes dos casos de VSCC parecem depender continuamente da ativação de EGFR e nestes casos, o uso de TKIs deve ser avaliado.
<i>Oonk et al., 2007, Nova Zelândia.</i>	197 pacientes T1/2, cirurgicamente tratados	IIQ para EGFR. An. Estat.: Regressão logística univariada e multivariada.	Marcação positiva para EGFR foi presente em 68% dos VSCCs e foi correlacionada com profundidade de invasão maior que 5mm.	Apesar da expressão de EGFR estar aumentada em grande parte dos tumores e estar associada à presença de metástases linfonodais inguinais, ele não é um valor preditivo de metástases.
<i>Brustmann, 2007, Áustria.</i>	82 pacientes: 10 epitélios normais, 24 VC, 26 HG-VIN, 7 d-Vin e 22 VSCC	IIQ para EGFR e Ki-67. An. Estat.: ANOVA, Tukey.	Imunoexpressão de EGFR aumentou significativamente de epitélio normal para VCs, VINs e VSCCs. Imunorreatividade forte foi notada em 41% dos VSCCs. Não houve relação entre EGFR e índice de proliferação por ki-67.	Os autores descrevem um aumento da expressão de EGFR à medida que as células se malignizam.
<i>Wu et al., 2001, China.</i>	25 VSCC, 10 VC, 15 VINs e 5 epitélios normais.	IIQ para EGFR e seus ligantes em vulva normal e VSCCs. An. Estat.: Não especificada.	EGFR foi detectado em 64% dos VSCCs, sendo visto no citoplasma em 100% das VSCCs.	Expressão de EGFR parece contribuir com as anormalidades neoplásicas essenciais em 64% dos VSCCs e o uso de terapias anti-EGFR devem ser consideradas para estas pacientes.
<i>Olawaiye et al., 2007, Estados Unidos.</i>	2 pacientes idosas com VSCC localmente avançado	Relato de caso. Caso#1: Tarceva (150mg/dia). Caso#2: 5-FU e quimioterapia com Cisplatina + radioterapia 2x ao dia + Tarceva (150mg/dia). An. Estat.: Não especificada.	Erlotinib (Tarceva) é um TKI de EGFR e, quando testado nas duas pacientes idosas casos #1 e #2, mostrou respostas dramáticas em ambos os casos.	A terapia com EGFR como alvo pode ser eficaz no tratamento de VSCC localmente avançado. Mais estudos são necessários para elucidar este aspecto.
<i>Richard et al., 2008, Estados Unidos.</i>	1 pacientes	Relato de caso. Paciente de 70 anos de idade com doença recorrente. Tratamento com radiação + Cetuximab + Cisplatina. An. Estat.: Não especificada.	Marcação de EGFR (não especificada pelos autores) mostrou 100% das células do tumor com escore 3+. A paciente mostrou resposta parcial por 5 meses, com paliativo dos sintomas.	Os autores sugerem o potencial uso de terapia anti-EGFR em mulheres com tumores recorrentes e/ou metastáticos.

	<i>Kim et al., 2009, Coréia.</i>	Linhagens de VSCC de vulva A431 e SW962	Foi examinado o efeito do inibidor de EGFR AG1478 sozinho e combinado com Cisplatina em culturas celulares de vulva. Western Blot e ensaios de proliferação. An. Estat.: Não especificada.	O inibidor AG1478 foi capaz de inibir a atividade de crescimento das células tumorais, dependendo do nível de expressão de EGFR pela inibição de AKT e ERK. Não houve sinergismo entre AG1478 com cisplatina.	Dada a falta de efeitos sinérgicos da combinação de AG1478 com Cisplatina, terapias combinadas em câncer de vulva devem ser avaliadas com cautela.
	<i>Sirotnak, 2003, Estados Unidos.</i>	Linhagem A431	ZD1839 foi administrado com agentes quimioterápicos ou radioterápicos em linhagem A431. An. Estat.: Não especificada.	Foi observado efeito aditivo antitumoral quando ZD1839 foi co-administrado com agentes quimioterápicos citotóxicos e radioterapia, não só em tumores avançados e metastáticos, como também nas lesões iniciais.	Estudos pré-clínicos continuam suportando a importância da ação tirosina-cinase de EGFR na biologia de tumores sólidos.
MYC	<i>Nakanishi et al., 2009, Japão.</i>	1 caso contendo áreas de VIN III (Bowen) e áreas de VSCC invasivo	DNA foi extraído de ambas as áreas, foi feito PCR e sequenciamento. Ensaio APOT (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts) foi realizado em amostras de 5 locais diferentes de cada lesão. An. Estat.: Não especificada.	HPV tipo 16 foi detectado em grande parte das amostras. Duas localizações de BD mostraram HPV16 somente na forma episomal, ao passo que outros 2 sítios de BD e em VSCC os transcritos eram derivados de integração. Sequenciamento mostrou que as VSCCs apresentaram sítio de integração em 8q24, o locus de MYC.	A integração do HPV a 8q24 é um dos passos críticos do desenvolvimento de carcinomas de vulva. Mais estudos com maior número de casos são necessários.
	<i>Milde-Langosch et al., 1991, Alemanha.</i>	44 casos (4 VSCC)	Hibridação in situ, dot blot, southern blot, northern blot e PCR para investigar DNA de HPV em pré-câncer de cérvix, vulva e endométrio. An. Estat.: Não especificada.	HPV estava presente em 3 dos 4 casos de VSCCs. Ativação de MYC foi vista em 3 carcinomas (Não especificado o tipo), mais marcadamente em um tumor de variante verrucosa, HPV-6.	Os autores sugerem possíveis contribuições dos eventos na ligação ao HPV na carcinogênese destes tumores.
	<i>Rivière et al., 1990, Alemanha.</i>	7 casos de lesões vulvares: 1 VIN I, 1 tumor granular de clitóris, 2 VSCCs, 1MLN e 2 CBCs + 2 linhagens celulares para controle	Foi avaliada a expressão de mRNA de c-MYC e HER-2 em epitélio normal, lesões pré-malignas e VSCCs (7 casos de lesão vulvar). Foi feita extração e northern-blot. An. Estat.: Não especificada.	Expressão de mRNA de c-MYC estava aumentada em lesões pré-malignas e tumores, mas não foi mostrada relação desta transcrição aumentada com grau do tumor ou estadiamento.	Mera expressão deste oncogene é um fenômeno comum em tecidos de diferentes histogêneses e a frequência de tumores com esta hiperexpressão pode variar em tumores de diferentes tipos.

<i>Pedrazzini et al., 2003, Argentina.</i>	Linhagem de VSCC A431	Cariótipo, FISH, M-FISH, Rx-FISH e CGH em linhagem A-431. An. Estat.: Não especificada.	Análises citogenéticas apontaram um cariótipo hipertriplóide, com número de cromossomos variando de 65 a 73 cromossomos. CGH mostrou amplificação em 22q~q24, indicando grande tamanho do amplicon.	É bem sabido que a desregulação de c-MYC fornece uma vantagem seletiva ao desenvolvimento do tumor e tecidos com esta proteína expressa de forma anormal, que podem ganhar vantagens de crescimento através da mutação em TP53, sendo tanto a amplificação de c-MYC quanto mutação em TP53 presentes na linhagem A-431.
<i>Tate et al., 1994, Estados Unidos.</i>	13 VSCC + amostras a fresco (não especificadas) + 8 SCC cervicais (3 FFPE e 5 a fresco)	DNA extraído de parafina para tipagem de HPV. PCR para identificar mutações em Ras (H-ras, Ki-ras and n-ras) e amplificação em c-MYC. An. Estat.: Não especificada.	Sete dos 13 VSCC foram positivos para HPV, sendo 6 HPV16 e 1 HPV33. Sequenciamento de Ras nos códons 12, 13 e 61 revelou ausência de mutações. Na análise de 7 VSCCs, nenhuma amplificação foi detectada no gene c-MYC.	Alterações em c-MYC não estão ligadas a VSCC ou à presença de ácidos nucleicos de HPV.
<i>Tervahauta, 1992, Finlândia.</i>	10 carcinomas de diferentes origens, incluindo 2 VSCCs.	Hiperexpressão de c-MYC foi avaliada por IIQ, PCR e ISH. An. Estat.: Não especificada.	Metade dos tumores (5/10) demonstraram hiperexpressão de mRNA de c-MYC por ISH e 2 amostras mostraram hiperexpressão por IIQ.	Os autores sugerem que, em alguns casos, o gene c-MYC pode ser adequadamente transcrito a mRNA mas não é traduzido na oncoproteína apropriada.

Legenda: VSCC, Carcinoma de Células Escamosas da Vulva; IIQ, Imunoistoquímica; An. Estat., Análise estatística; FISH, Híbridação *in situ* Fluorescente; VIN, Lesão Vulvar Intraneoplásica; PCR, Reação em Cadeia da Polimerase; T1/2, T1 (≤2 cm); T2 (> 2cm); FFPE, Tecido Fixado em Formalina Emblocado em Parafina; VC, Condilomas Vulvares; HG-VIN, VIN de Alto Grau; d-VIN, VIN Diferenciada; M-FISH, Multicolor FISH; RxFISH, FISH com bandamento colorido; CGH, Híbridação Genômica Comparativa; CBC, Carcinoma Basocelular; ISH, Híbridação *in situ*; MLN, Metástase Linfonodal.

Anexo 2 - Protocolo de Coleta de Dados Clínicos (SAME)

Nº ficha:

[_____]

Departamento de Ginecologia – Hospital A.C.Camargo

Nome: _____

RGH:[_____]

Data admissão (Ginecologia):[/ /] *data_admis*

Dados demográficos

1. **Data nascimento:** [/ /]
data_nasc
2. **Idade ao diagnóstico(anos):** []
idade
3. **Raça:** [1] branca [2] negra [3] parda [4] amarela [99] ignorado [] *cor*
4. **Estado civil:** [1] solteira [2] casada [3] separada [4] viúva [99] ignorado [] *civil*
5. **Escolaridade:** [0] analfabeto [1] 1º incompleto [2] 1º completo [] *escola*
[3] 2º incompleto [4] 2º completo [5] superior incompleto [6] superior completo [99]
ignorado

Dados clínicos

6. **Sintomas:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *sintomas*
 - a. **Ulceração:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *ulcera*
 - b. **Tumor:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *tumor*
 - c. **Prurido:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *prurido*
 - d. **Secreção:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *secrecao*
 - e. **Sangramento:** [0] não [1] sim [99] ignorado..... [] *sangue*
 - f. **Outro sintoma:** [] *outro_sint*
7. **Duração dos sintomas (meses):** [99] ignorado..... [] *durac_sint*
8. **Menarca (idade):** [99] ignorado..... [] *menarca*
9. **Menopausa (idade).....** [0] ainda no menacme [99] ignorado..... []
menopa
10. **Coitarca (idade):** [99] ignorado..... [] *coitarca*
11. **Parceiros (número):** [100] incontáveis ... [99] ignorado..... []
num_par
12. **Gestações (número):** [99] ignorado..... [] *gesta*
13. **Partos (número):** [99] ignorado..... [] *parto*

14. **Abortos (número):** [99] ignorado..... [] *aborto*
15. **Anticoncepcional oral:** [0] não [1] sim-atual [2] sim-passado [99] ignorado [] *aco*
16. **Etilismo:** [0] não [1] sim-atual [2] sim-passado [99] ignorado..... [] *álcool*
17. **Tabagismo:** [0] não [1] sim-atual [2] sim-passado [99] ignorado..... [] *tabaco*
18. **Lesões associadas:** [0] não [1] líquen escleroso [2] NIV [] *lesao_assoc*
 [3] Paget [4] condiloma/HPV [5]
 outra _____

19. Localização:

- a. **Grande lábio** [0] não [1] sim..... [] *gde_lab*
- b. **Pequeno lábio** [0] não [1] sim..... [] *peq_lab*
- c. **Clitóris**..... [0] não [1] sim..... [] *clitoris*
- d. **Períneo** [0] não [1] sim..... [] *perineo*
20. **Lateralidade:** [1] unilateral [2] bilateral..... [] *lado*
 [3] central [4] unilateral-compromete linha média
21. **Extensão estruturas adjacentes:** [0] não [1] sim..... [] *adjac*
- a. **Uretra distal (1/3 inf):** [0] não [1] sim..... []
uretra_dist
- b. **Uretra proximal (2/3 sup):** [0] não [1] sim..... [] *uretra_prox*
- c. **Vagina distal (1/3 inf):** [0] não [1] sim..... []
vagina_dist
- d. **Vagina proximal (2/3 sup):** [0] não [1] sim..... []
vagina_prox
- e. **Ânus:** [0] não [1] sim..... [] *anus*
- f. **Bexiga:** [0] não [1] sim..... [] *bexiga*
- g. **Reto:** [0] não [1] sim..... [] *reto*
- h. **Parede óssea:** [0] não [1] sim..... [] *osso*

22. Avaliação linfonodal pré-op:

- a. **LND inguinal palpável:** [0] não [1] unilateral [2] bilateral [] *LND_palp*
- b. **LND ulcerado ou fixo:** [0] não [1] sim..... [] *LND_ulcer*
- c. **LND na TC pelve:** [0] não [1] inguinal [2] pélvico [3] ambos [] *LND_TC*

Dados do tratamento

23. Tipo de tratamento:

- a. **Cirurgia:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *cirurgia*
- b. **RxT neoadjuvante:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *rx_t_neo*
- c. **QT neoadjuvante:** [0] não [1] sim [99] ignorado [] *qt_neo*
- d. **RxT adjuvante:** [0] não [1] sim [99] ignorado []
rx_t_adj

- e. **QT adjuvante:** [0] não [1] sim [99] ignorado []
qt_adj
24. **Resultado neoadj:** [1] resposta completa [2] resposta parcial [] *result_tto*
 [3] doença estável [4] progressão dç [88] não se aplica
25. **Data da cirurgia:** [/ /] *data_cir*
26. **Cirurgia vulva:** [1] ressecção local ampla [2] hemivulvectomy [] *cir_vulva*
 [3] vulvectomy radical clássica [4] vulvectomy radical tripla
 incisão
27. **Cirurgia inguinal:** [0] nenhum [1] LND inguinofemoral bilateral..... [] *LND_ing*
 [2] LND inguinofemoral unilateral [3] LND inguinal superficial
 bilateral
 [4] LND inguinal superficial unilateral
28. **Linfadenectomia pélvica:** [0] não [1] sim [] *LND_pelv*
29. **Reconstrução:** [0] não [1] retalho local [2] grácil [3] reto abdominal [] *reconstr*
 [4] tensor fáscia lata [5] glúteo [6] outra
30. **Complicações:** [0] não [1] sim..... [] *complic*
- a. **Seroma:** [0] não [1] sim [] *seroma*
- b. **Infecção ferida:** [0] não [1] sim [] *infec_FO*
- c. **Deiscência ferida:** [0] não [1] sim [] *deisc_FO*
- d. **Necrose retalho:** [0] não [1] sim ... [] *necrose_ret*
- e. **Linfedema:** [0] não [1] sim [] *linfedema*
- f. **Outra complicação:** []
outr_complic

Dados anatomo-patológicos

31. **Número AP:** [] *num_AP*
32. **Tipo histológico:** [1] CEC [2] adenocarcinoma [3] ca verrucoso.. [] *tipo_histol*
 [4] CBC [5] carcinoma SOE [7] outro_____
33. **Tamanho (cm):** [99] ignorado..... [] *tam_tu*
34. **Invasão estromal / espessura (mm):** [99] ignorado..... [] *espess_tu*
35. **Invasão vasos linfáticos:** [0] não [1] sim [99] ignorado..... [] *IVL*
36. **Invasão vasos sangüíneos:** [0] não [1] sim [99] ignorado..... []
IVS
37. **Invasão perineural:** [0] não [1] sim [99] ignorado..... [] *IPN*
38. **Índice mitótico:** [99] ignorado..... [] *mitose*
39. **Grau histológico:** [99] ignorado..... [] *grau_histol*
40. **Margens cirúrgicas:** [0] livres [1] comprometidas [99] ignorado [] *margem*

41. **Distância margem livre (mm):** [88] não se aplica [99] ignorado []
margem_mm

42. Linfonodos dissecados (número):

- a. **Inguinal superficial:** [] *LNDdis_sup*
- b. **Inguinal profundo:** [] *LNDdis_prof*
- c. **Pélvico:** [] *LNDdis_pelv*

43. Linfonodos comprometidos (número):

- a. **Inguinal superficial:** []
LNDpos_sup
- b. **Inguinal profundo:** [] *LNDpos_prof*
- c. **Pélvico:** [] *LNDpos_pelv*

44. **Lateralidade linfonodos positivos:**[1] uni [2] bilateral [99] ignorado [] *LND_lateral*

45. **Transposição capsular:** [0] não [1] sim [99] ignorado..... []
LND_capsula

Dados de Estadiamento

46. **FIGO:** [1] I A [2] I B [3] II [4] III A..... []
FIGO

[5] III B [6] IIIC [7] IV A [8] IV B

Dados de seguimento

47. **Recidiva:** [0] não [1] sim..... [] *recidiva*

48. **Padrão recidiva:** [1] local [2] linfonodal [3] distância [4] locorregional +
distância []
padrao_rec

49. **Data da recidiva locorregional:** [/ /]
data_rec_loc

50. **Data da recidiva distância:** [/ /]
data_rec_dist

51. **Resgate:** [0] nenhum [1] Cirurgia [2] RxT [3] QT [] *resgate*
[4] RxT + QT [5] RxT + Cir [6] QT + Cir [7] Cir + RxT + QT

52. **Data último seguimento:** [/ /]
status_data

53. **Status:** [0] vivo sem câncer [1] vivo com câncer [3] MOCA..... []
status

[4] morte sem câncer [5] morte sem especificação

Anexo 3 - Produção Científica Vinculada à Dissertação

Abaixo, estão relacionadas as publicações que, até o momento, foram frutos dos resultados obtidos pelo presente projeto, além de resumos publicados e apresentados em anais de congressos, bem como os próximos passos.

A Etapa de Publicação de Resultados

1- Artigo submetido à revista **Cancer Investigation**, intitulado "*Characterization of socio-demographic and clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma*" (Manuscript ID: **LCNV-2011-0290**).

**Characterization of socio-demographic and
clinicopathological features in Brazilian patients with vulvar
squamous cell carcinoma**

Journal:	<i>Cancer Investigation</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Maia, Beatriz; Hospital AC Camargo, Anatomic Pathology Cestari, Flávia; Hospital AC Camargo, Gynecologic Oncology Department Baiocchi, Glauco; Hospital AC Camargo, Gynecologic Oncology Department Lavorato-Rocha, André; Hospital AC Camargo, Anatomic Pathology Department Rodrigues, Iara; Hospital AC Camargo, Anatomic Pathology Department Guimarães, Gustavo; Hospital AC Camargo, Pelvic Surgery Department Vassallo, José; Hospital AC Camargo, Anatomic Pathology Department; State University of Campinas Medical School Stiepcich, Mônica; Fleury Institute, Pathology Department Soares, Fernando; Hospital AC Camargo, Anatomic Pathology Department Rocha, Rafael; Hospital AC Camargo, Anatomic Pathology Department
Keywords:	Other Gynecologic Tumors, Treatment, Epidemiology and Outreach

2-Artigo submetido à revista **Clinics**, intitulado "*Molecular aspects of vulvar carcinoma*" (Manuscript ID **CLINICS-D-11-00112**).

Please verify your contribution to **Molecular aspects of vulvar carcinoma**  

Entrada |  beatriz.melomaia@gmail.com | 

★ Clinics mrsilva36@hcnet.usp.br para Beatriz [mostrar detalhes](#) 10 out (10 dias atrás)  Responder 

Oct 10 2011 9:56:45

Dear Miss Maia,

CLINICS HAS AN AVERAGE IMPACT FACTOR: 1.54

A manuscript entitled *Molecular aspects of vulvar carcinoma* has been submitted by André Mourão Lavorato-Rocha to CLINICS. You are listed as a co-author for this manuscript. Please verify your contribution by clicking one of the below links.

Yes, I am a co-author: <http://clinics.edmgr.com/l.asp?i=2643&l=AS7H40G5>

No, I am not a co-author: <http://clinics.edmgr.com/l.asp?i=2644&l=JRIYSKKW>

If you click on Yes you will be directed to CLINICS manuscript managing system. You must either type in your login and password or click on Register Now. The system will guide you through the process.

Sincerely,

CLINICS Editorial Office
clinics.office@hcnet.usp.br

3- Artigo em fase de adequação aos critérios da revista **Journal of Clinical Oncology** intitulado "*HER-2 and EGFR expression in vulvar carcinomas: correlation with prognostic factors and clinical data*".

B Trabalhos publicados em congressos

- 1 **Maia BM**, Lavorato-Rocha A, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Cestari FM, Baiocchi G, Guimaraes GC, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. HER-2 and EGFR in vulvar carcinomas: predictors of poor prognosis? In: **IV Encontro de Patologia Investigativa do Hospital A.C. Camargo**, 2011, São Paulo.
- 2 **Maia BM**, Lavorato-Rocha A, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Baiocchi G, Guimaraes GC, Stiepcich MM, Soares FA, Dias-Neto E, Rocha RM. ERBB family alterations in vulvar carcinoma: correlation with prognostic factors, clinical data and protein expression. In: **2nd AC Camargo Global Meeting - School of Science**, 2011, São Paulo.
- 3 **Maia BM**, Rodrigues IS, Lavorato-Rocha A, Baiocchi G, Guimaraes GC, Cestari FM, Soares FA, Stiepcich MM, Rocha RM. HER-2 and EGFR as a target for vulvar carcinoma. In: **XXVII Congresso Brasileiro de Patologia e XXVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología**, 2011, Maceió.
- 4 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.
- 5 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: **17th Congress of the European Society of Gynecologic Oncology, International Journal of Gynecological Cancer**, 2011, Milão.
- 6 Baiocchi G, Cestari F, Cestari LA, Rocha R, Kumagai LY, Faloppa CC, Badiglian-Filho L, Oliveira RAR, Rodrigues I. **Maia BM**, Lavorato-Rocha A,

Fukazawa EM, Guimarães GC, Soares FA. Pelvic lymph node metastasis in vulvar cancer. In: **17th Congress of the European Society of Gynecologic Oncology, International Journal of Gynecological Cancer**, 2011, Milão.

Anexo 4 - Próximos Passos

Como próximos passos do presente trabalho, pretendemos continuar a escrita das publicações dos demais resultados obtidos pelo presente projeto e, como possível projeto futuro, pretendemos realizar uma avaliação do papel de microRNAs em carcinomas de vulva na presença e ausência da infecção pelo vírus do HPV, já que a expressão desregulada destas moléculas tem sido demonstrada como um dos maiores determinantes da tumorigênese. Deste modo, pretendemos realizar a caracterização do perfil de expressão de miRNAs em amostras de carcinomas de vulva na presença e ausência de HPVs de alto risco, a busca *in silico* dos principais alvos destes microRNAs e, ainda, a avaliação *in vitro* da expressão destes alvos dos microRNAs na presença de miméticos destas moléculas ou anti-miRNAs.