

**RELAÇÃO ENTRE STATUS DO HPV E REAÇÃO
INFLAMATÓRIA RELACIONADA AO TUMOR NO
CARCINOMA DA VULVA E SUAS LESÕES
PRECURSORAS**

FLÁVIA LOPES DE LIMA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. José Vassallo

**Co-Orientadores: Dr. Rafael Malagoli Rocha e
Dra. Iara Sant'Ana Rodrigues**

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lima, Flávia Lopes de

Relação entre status do HPV e reação inflamatória relacionada ao tumor no carcinoma da vulva e suas lesões precursoras / Flávia

Lopes de Lima – São Paulo, 2015.

108p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. INFLAMAÇÃO. 2. PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) 3. CARCINOMA. 4. CÂNCER DA VULVA. 5. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais essenciais em minha vida; àqueles que me incentivaram a sempre correr atrás dos meus sonhos: meu pai, José Luiz de Lima e minha mãe, Zuleika da Silva Lopes Lima. O caminho até aqui foi difícil, mas não teria sido possível sem o amor, o carinho e o apoio de vocês.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. José Vassallo**, nenhuma palavra que eu escrevesse seria capaz de expressar toda a minha satisfação e agradecimento por tê-lo como exemplo. Agradeço por ter aceitado a missão de me orientar, por ter sido sempre muito atencioso, por ter me ensinado não só os temas deste trabalho e, acima de tudo, por ter estado ao meu lado todo o tempo.

À minha co-orientadora, **Dra. Iara Sant'Anna Rodrigues**, toda a minha gratidão e meu agradecimento pelos dias, noites e finais de semana que você dispensou para me ensinar e me ajudar no que fosse preciso. Este trabalho não seria possível sem a sua ajuda, seus conselhos e suas correções. Agradeço por ter me incentivado a melhorar e por me passar conhecimentos valiosos.

Ao **MSc. Julio Cirullo Neto** por me ensinar os experimentos práticos de imunoistoquímica e por ter passado dias intermináveis me auxiliando nos experimentos. Obrigada pela ajuda, pela paciência e pelos momentos de descontração.

À **Melissa Pool Pizzi**, pelos intensos finais de semana me auxiliando na análise das minhas lâminas de imunoistoquímica. Acima de tudo, por sempre oferecer ajuda, pelas palavras de carinho e pela amizade.

Ao **Dr. Frederico Gleber Netto**, por tirar minhas dúvidas e sempre se dispor a me ajudar em tudo que fosse preciso. Agradeço por ter conhecido pessoas boas e solícitas como você.

À **Dra. Mônica M. A. Stiepcich**, pela longa manhã me transmitindo todo o seu conhecimento sobre o tema deste trabalho.

Ao **Dr. Victor Piana de Andrade**, por ter se disposto a tirar minhas dúvidas e discutir diversas vezes sobre as questões de análise dos meus marcadores.

Ao patologista **Leonardo Lordello**, por me ensinar e analisar comigo a morfologia das células inflamatórias de todas as minhas lâminas.

À **Pós-graduação**, à **Biblioteca**, ao **Arquivo** e ao **SAME** pela prestatividade e atenção dispensada no atendimento e auxílio deste trabalho.

De forma especial, à **Liliane**, por ser a forma mais direta de contato com meu orientador, pelos conselhos, paciência, pelas palavras e por ter chorado (literalmente) comigo durante meus momentos de angústia e sofrimento.

Ao **Ivan**, **Severino**, **Marina França** e **Carlinhos**, por atenderem com prontidão e atenção no auxílio às técnicas realizadas, sempre que necessário.

À Dra. **Claudia Malheiros Coutinho-Camillo**, por tirar minhas dúvidas e por ceder reagente, quando necessário.

À minha **família**, que mesmo longe, foram minha fonte de renovação e energia nos momentos em que eu achei que não fosse capaz de seguir em frente. Agradeço por compartilharem comigo todos esses momentos e por estarem ao meu lado nas minhas decisões.

Ao meu amigo, companheiro e namorado **Fábio Milfont Lemos**, que mesmo sem entender a turbulência dos meus piores momentos, sempre me ofereceu inventivo e palavras de carinho. A você todo meu amor, meu carinho e minhas sinceras desculpas pelos dias ruins que você, mais do que ninguém, enfrentou comigo.

Aos amigos que eu ganhei ao longo dessa jornada: **Beatriz, Isabella, Kivvi, Fernanda, Felipe Ilelis e Felipe Fidalgo**. O meu agradecimento é especialmente pelos dias difíceis em que pude contar com as palavras de apoio e carinho de vocês. Sem vocês o caminho teria sido muito mais difícil.

À **Vanessa Pereira**, por nunca negar ajuda e pelas palavras de incentivo que me ofereceu nos momentos que precisei.

A **Deus**, por ser minha fonte inesgotável de fé, por ter guiando meu caminho e ter me dado forças para chegar ao fim desta etapa.

À **CAPES** pelo apoio financeiro e à **Fundação Antônio Prudente**, por disponibilizar toda a infraestrutura para a realização desse trabalho.

RESUMO

Lima FL. **Relação entre status do HPV e reação inflamatória relacionada ao tumor no carcinoma da vulva e suas lesões precursoras.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O carcinoma invasivo (CAI) de vulva corresponde a cerca de 3 a 5% dos tumores malignos do trato genital feminino. Sua patogênese compreende uma via que acomete principalmente mulheres idosas, relacionada a mutações no gene *TP53* e outra associada à infecção pelo papilomavirus humano (HPV) em mulheres mais jovens. Em ambas as vias, o carcinoma é precedido por lesões precursoras (neoplasias intraepiteliais vulvares - NIVs). O aumento da frequência de infecção pelo HPV explicaria o relativo aumento de incidência em pacientes mais jovens. É crescentemente reconhecida a importância do processo inflamatório na progressão do câncer, porém tais estudos são escassos no CAI de vulva. **OBJETIVOS:** Caracterizar e avaliar o papel do infiltrado inflamatório na progressão das lesões precursoras em CAI da vulva, seu valor prognóstico no carcinoma e seu comportamento em relação ao status do HPV. **MÉTODOS:** Amostras de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram selecionadas de forma retrospectiva dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center no período de 1980 a 2013. Um total de 110 pacientes foi estudado: 21 com NIV de baixo grau (NIV BG), 45 com NIV de alto grau (NIV AG) e 44 com CAI. A caracterização morfológica do infiltrado inflamatório foi feita em lâminas coradas rotineiramente com H&E. O fenótipo dos tipos celulares foi determinado por imunoistoquímica e sua quantificação foi efetuada através da captura e análise de imagens no sistema APERIO®. Foram analisadas regiões peri- e intratumorais (CAI P e CAI I) hotspots para cada tumor. A informação sobre o status do HPV nos casos de CAI (19/44, ou 43,2%) determinada em trabalho anterior foi utilizada para comparar a intensidade dos diferentes tipos celulares.

RESULTADOS: Linfócitos e plasmócitos aumentaram gradativamente de lesões precursoras até, de forma mais intensa, no carcinoma invasivo. No CAI I, a forte expressão de linfócitos apresentou associação com menor profundidade de invasão ($p=0,010$) e ausência de invasão vascular ($p=0,008$), ao passo em que a intensa expressão de plasmócitos apresentou associação com ausência de metástase linfonodal ($p=0,033$) e doenças associadas ($p=0,018$). Em NIV AG, a baixa densidade de CD3 e a alta expressão de CD8 apresentou associação com o etilismo ($p=0,038$) e com a presença de doenças associadas ($p=0,036$), respectivamente. A elevada expressão de CD3 esteve associada com a menor profundidade de invasão ($p=0,004$) em CAI I. A intensa expressão de CD8 esteve associada com menor profundidade de invasão ($p=0,039$) no CAI I e com o tabagismo ($p=0,037$) em CAI P. A expressão forte de FOXP3 no CAI I apresentou associação com menor profundidade de invasão ($p=0,011$), ausência de invasão vascular ($p=0,030$) e perineural ($p=0,026$) e em CAI P, esteve associado com ausência de invasão vascular ($p=0,016$). Além disto, a presença destes marcadores associou-se com aumento na sobrevida câncer específica e livre de doença das pacientes com carcinoma invasivo de vulva. CD4 peri e intratumoral e CD8 intratumoral apresentaram associação com a presença de HPV ($p=0,007$; $0,048$ e $0,035$). Baixas quantidades de CD4 no carcinoma invasivo contribuem para o aumento de sobrevida global e câncer específica das pacientes. **CONCLUSÕES:** O presente estudo permitiu caracterizar o infiltrado inflamatório e demonstrar que existem diferenças significativas durante a progressão das lesões precursoras até carcinoma, influenciável pela infecção do HPV. Além disso, alguns dos marcadores analisados estiveram relacionados a parâmetros clinicopatológicos, com valor prognóstico.

SUMMARY

Lima FL. **[Relationship between HPV status and an inflammatory reaction related to tumor cell carcinoma of the vulva and its precursor lesions]**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Vulva invasive carcinoma (VICA) represents 3-5% of malignant neoplasia of female genital tract. Its pathogenesis comprises a pathway related to mutations on TP53 gene mainly in older women and another one related to infection with human papillomavirus (HPV) in younger patients. In both mechanisms, carcinoma is preceded by precursor lesions (vulvar intraepithelial neoplasia - VIN). Increased incidence of HPV infections seem to be related to a relative increase of VICA in younger women. The importance of tumor inflammation is increasingly recognized in cancer progression; however, it has been scarcely addressed in VICA. **AIMS:** To characterize and evaluate the role of inflammatory infiltrate in the progression of precursor lesions in VICA, its prognostic value and its changes related to HPV status. **METHODS:** Formalin fixed paraffin embedded tissue samples were retrospectively selected from the files of the Anatomic Pathology Department in A C Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil, between 1980 and 2013. A hundred and ten patients were studied: 21 with low grade VIN (VIN LG), 45 with high grade VIN (VIN HG), and 44 with VICA. Morphological characterization of the inflammatory infiltrate was achieved by H&E stained slides. Inflammatory cells phenotype was accomplished by immunohistochemistry and quantified by APERIO® system. Peri- and intratumoral (VICA P and VICA I) hotspot regions were evaluated for each tumor. HPV status information was retrieved from a previous study using the same samples (19/44, or 43.2%) and it was also used to compare the intensity of different cell types in both groups. **RESULTS:** Lymphocytes and plasma cells increased gradually from precursor lesions even more intensely

in invasive carcinoma. In VICA I, high expression of lymphocytes was associated with lower invasion depth ($p=0.010$) and absence of vascular invasion ($p=0.008$), while the intense expression of plasma cells was associated with associated diseases ($p=0.018$) and the absence of lymph node metastasis ($p=0.033$). In VIN HG, low density of CD3 and high expression of CD8 markers were associated with alcohol consumption ($p=0.038$) and the presence of associated diseases ($p=0.036$), respectively. High expression of CD3 was associated with lower invasion depth ($p=0.004$) in VICA I. Strong expression of CD8 was associated with lower invasion depth ($p=0.037$) in VICA P. High expression of FOXP3 was associated with absence of vascular invasion ($p=0.016$) in VICA P and lower invasion depth ($p=0.011$), absence of vascular invasion ($p=0.030$) and perineural invasion ($p=0.026$) in VICA I. Moreover, the presence of these markers was associated with increased specific cancer survival and disease-free survival of patients with vulva invasive carcinoma. Peri- and intratumoral CD4 and intratumoral CD8 were associated with the presence of HPV ($p=0.007$, $p=0.048$ and $p=0.035$). Low CD4 concentrations in invasive carcinoma contribute to increase specific and overall survival in cancer patients.

CONCLUSIONS: Herein it was shown that there are significant differences in the intensity of the inflammatory infiltrate from VIN to VICA. Further, some of the lymphoid markers were related to clinicopathologic parameters, with prognostic value.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama da anatomia vulvar.....	2
Figura 2	Expressão dos marcadores entre os grupos de neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau (NIV BG), neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau (NIV AG), carcinoma invasivo intratumoral (CAI I) e carcinoma invasivo peritumoral (CAI P).....	53
Figura 3	Marcação imunoistoquímica de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 em neoplasia intraepitelial vulvar.....	55
Figura 4	Marcação imunoistoquímica de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 em carcinoma invasivo da vulva.....	56
Figura 5	Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador.....	63
Figura 6	Sobrevida câncer específica relacionada à expressão dos marcadores.....	64
Figura 7	Sobrevida livre de doença associada à expressão dos marcadores inflamatórios.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos primários, clones, fabricantes, diluições e padrões de marcação utilizados nas reações de imunoistoquímica.....	40
Tabela 2	Média, desvio padrão, mediana e variação de idade (em anos) de acordo com os tipos histológicos.....	43
Tabela 3	Características demográficas e comportamentais em neoplasias intraepiteliais vulvares.....	45
Tabela 4	Características clínico-patológicas e infecção por HPV em carcinomas invasivos vulvares.....	46
Tabela 5	Avaliação visual das células inflamatórias no estroma de neoplasias intraepiteliais vulvares e do carcinoma invasivo (regiões intra- e peritumoral).....	47
Tabela 6	Características clínico-patológicas associadas às células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos*) em neoplasia intraepitelial vulvar.....	49
Tabela 7	Características clínico-patológicas associadas as células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos*) em carcinoma invasivo.....	50
Tabela 8	Valores medianos da expressão moderada/forte dos marcadores linfóides em neoplasia intraepitelial vulvar e no carcinoma invasivo da vulva.....	51

Tabela 9	Associações entre a expressão moderada/forte de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 e os dados demográficos nas neoplasias intraepiteliais vulvares.....	58
Tabela 10	Expressão forte/moderada de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 versus dados clínico-patológicos em carcinoma invasivo.....	60
Tabela 11	Status do HPV e a expressão moderada/forte dos marcadores em carcinoma vulvar invasivo.....	61
Tabela 12	Sobrevidas global, câncer específica e livre de doença e sua relação com a expressão moderada/forte dos marcadores linfoides no carcinoma invasivo nas regiões Peri e intratumoral.....	63
Tabela 13	Sobrevida global, câncer específica e livre de doença e sua relação com as características clínico-patológicas no carcinoma invasivo da vulva.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCamargo	Antônio Cândido Camargo
Akt	Proteína kinase B
CA	Carcinoma
CAI I	Carcinoma invasivo, região intratumoral
CAI P	Carcinoma invasivo, região peritumoral
CAI	Carcinoma invasivo
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CD4-cre	Gene recombinante que contém intensificadores, promotores e sequências silenciadoras de CD4
CD3	Linfócitos T; associado ao receptor de antígeno de células T
CD1a	Proteína humana " <i>Cluster of Differentiation 1a</i> "
CD20	Linfócitos B; Regula a ativação de células B
CD25	Linfócitos T e B ativadas; cadeia do α receptor IL-2
CD4	Linfócitos T; correceptor de moléculas do complexo de principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II
CD44	Leucócitos, eritrócitos; Mede a adesão de leucócitos
CD8	Linfócitos T; correceptor de moléculas do complexo de principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I
CEC	Carcinoma de células escamosas
CO₂	Dióxido de carbono
CTLA-4	Linfócito T citotóxico associada a proteína 4
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleosídeo 5'-trifosfatos
DSI	Doenças do sistema imune
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
dUTP	Trifosfato deoxiuridina
FDA	" <i>Food and drug administration</i> "
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FOX1	<i>Forkhead box 1</i> ; Família de proteínas de ligação a RNA
FOXO3	<i>Forkhead box O3</i> ; Família de proteínas; supressor tumoral
FOXP3	<i>Forkhead box 3</i> ; Família de proteínas; proteínas envolvida na resposta imunológica
H2TC	Plataforma interna do ACCamargo Cancer Center de visualização de prontuários para pesquisa
HLA-DR	<i>“human leukocyte antigens”</i> ; receptor de superfície de MHC classe II; estimula produção de linfócitos B
HPV	vírus do papiloma humano
HRP	<i>“horseradish peroxidase”</i> ; polímero de detecção
SPSS	<i>“Statistical Package for Social Science”</i> ; programa estatístico
IARC	<i>“International Agency for Research on Cancer”</i> ; Agência Internacional para pesquisa em câncer
IFN	Interferon; proteína produzida pelos leucócitos e fibroblastos
IHC	Immunohistochemistry; imunoistoquímica
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 β ;
ISSVD	Sociedade Internacional para o estudo de doença vulvo-vaginais
NCI	<i>“National Cancer Institute”</i> ; Instituto Nacional do Câncer
NF-Kβ	<i>“factor nuclear kappa B”</i> ; fator de transcrição e efetor de resposta imune à infecção
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIV AG	Neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau
NIV BG	Neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau
NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
NIVA	Neoplasia intraepitelial vaginal
MÁX	Máximo
Mg	Magnésio
Min	Minutos
MÍN	Mínimo
mL	Mililitros

mm	Milímetros
p	Nível de significância
p14	proteína p14
p14ARF	proteína supressora tumoral
p16	proteína p16
p53	proteína p53
pB	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino
pH	potencial hidrogeniônico
Pi	Porcentagem de pixel
PI3K	fosfatidil inositol 3,4,5 cinase
pRB	proteína do retinoblastoma
Rb	gene do retinoblastoma
SAME	Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos
Smad3	Membro 3 da família de proteína <i>Smad</i>
Smad4	Membro 4 da família de proteína <i>Smad</i>
TAA	Antígeno associado a tumor
Th1	Linfócitos T helper
Th2	Linfócitos T helper
TLR-9	<i>"Toll-like receptor 9"</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TP53	gene de proteína tumoral p53
T_{reg}	Linfócitos T regulatórios
UNG	Uracil-N-glicosilase
VS	<i>versus</i>
°C	Grau Celsius
μL	Microlitros
Σ	Somatório

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Anatomia e histologia vulvar	1
1.2	Neoplasias vulvares	2
1.2.1	Neoplasia intraepitelial vulvar (NIV).....	4
1.2.2	Incidência e etiopatogênese	6
1.2.3	Sinais, sintomas e tratamento	8
1.3	Carcinoma de células escamosas da vulva (CEC).....	10
1.3.1	Incidência	10
1.3.2	Sinais, sintomas e tratamento	11
1.3.3	Fatores de prognóstico	14
1.3.4	Etiologia e patogênese	16
1.4	Papel do papilomavírus humano no desenvolvimento tumoral.....	17
1.5	Sistema imune e a progressão tumoral	23
1.6	Imunoterapia.....	29
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
4.1	Casuística.....	34
4.2	Critérios de exclusão	34
4.3	Coleta de dados clínicos.....	35
4.4	Tipagem do HPV	35
4.5	Avaliação da morfologia do infiltrado inflamatório	38
4.6	Imunoistoquímica	38
4.7	Avaliação imunoistoquímica	40
4.8	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Dados das pacientes	43

5.2	Morfologia do infiltrado inflamatório nas lesões neoplásicas e no carcinoma vulvar	47
5.3	Caracterização da expressão de marcadores linfoides (CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3) nas neoplasias intraepiteliais vulvares e carcinoma invasor da vulva	51
5.4	Análise da expressão dos marcadores linfoides (CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3) nas neoplasias intraepiteliais vulvares e carcinoma invasor da vulva em relação aos dados demográficos e clínico-patológicos	57
5.5	Análise da expressão de marcadores linfoides (CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3) no carcinoma invasor da vulva e sua relação com o status molecular do HPV	61
5.6	Análise das sobrevidas global, câncer específica e livre de doença, segundo a expressão dos marcadores linfoides (CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3) no carcinoma invasor da vulva	62
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	86
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente-CEP
- Anexo 2** Classificação morfológica das neoplasias vulvares segundo a Organização Mundial da Saúde
- Anexo 3** Patogênese das lesões precursoras do carcinoma epidermóide da vulva, neoplasia intraepitelial cervical vulvar
- Anexo 4** Estadiamento FIGO (2009) para o carcinoma de vulva
- Anexo 5** Patogênese dos carcinomas da vulva

APÊNDICE

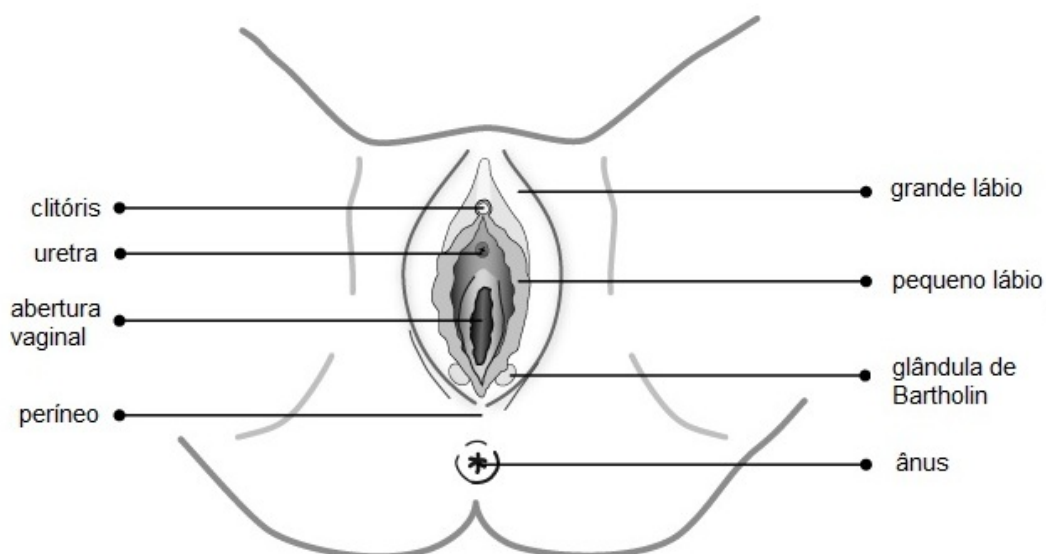
- Apêndice 1** Reatividade e padrão de marcação dos anticorpos

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA VULVAR

A genitália externa feminina, também denominada vulva, é composta pelo clitóris, grandes e pequenos lábios, orifício uretral e glândulas maiores (Bartholin) com abertura no vestíbulo, que compreende a região de abertura externa da vagina (Figura 1) (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2008).

Devido à umidade e presença de pêlos, a vulva se torna um local suscetível a infecções e inflamações decorrentes de microorganismos e distúrbios dermatológicos. A região sofre influência de diversos fatores como: secreções vaginais, excrementos (fezes e urina), além do trauma ocasionado por produtos de higiene íntima e pelo vestuário. Além disso, a atividade sexual também predispõe o local ao contágio com doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). As infecções causadas por agentes patogênicos produzem reações diferentes, uma vez que a região apresenta tipos histológicos variados, o que torna mais complexa a avaliação dessas doenças (MARTINS 1999; FONSECA-MOUTINHO 2008; MONTAG e KUMAR 2008; CARTWRIGHT-ALCARESE e O'SULLIVAN 2010). A presença de doenças inflamatórias crônico-vulvares, histórico de carcinomas ou verrugas genitais, lesões ou tabagismo pode aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias nessa região (PINTO 2002).



Fonte: Adaptado de Canadian Cancer Society-CCS (2015).

Figura 1 - Diagrama da anatomia vulvar

1.2 NEOPLASIAS VULVARES

Dentre as neoplasias vulvares malignas o tipo mais freqüente é o carcinoma de células escamosas ou epidermóides (CEC), que corresponde a cerca de 95% das neoplasias vulvares (PINTO 2002; MOORE et al. 2005; ALKATOUT et al. 2015). O melanoma é o segundo tipo mais comum dos 5% restantes, e estas lesões acometem geralmente os pequenos lábios e clitóris. Dessa forma, qualquer lesão pigmentada nessas regiões deve ser submetida a investigação diagnóstica (ALKATOUT et al. 2015). Os outros tipos histológicos de menor frequência compreendem os adenocarcinomas, sarcomas, basocelulares e doença de Paget (HOLSCHNEIDER e BEREK 2002). Um quadro com a classificação das neoplasias vulvares publicada pela Organização Mundial da Saúde pode ser visto no Anexo 2.

O grupo dos CECs é subdividido em: carcinomas queratinizantes (contendo pérolas córneas), não queratinizantes (formado por células escamosas com queratinização individual, sem pérolas córneas), basalóides (formado por células de citoplasma escasso, sem pérolas córneas; pode estar associado ao HPV, em particular o tipo 16), condilomatoso (com características histológicas sugestivas de infecção pelo HPV) e o verrucoso (lesão exofítica exuberante, de baixo poder metastático, frequentemente associado ao HPV, em particular do tipo 6) (ALKATOUT et al. 2015). O grupo predominante é o queratinizante, correspondendo aproximadamente 65 a 80% dos CECs. Os carcinomas queratinizantes acometem mulheres após a menopausa e apresentam como característica a formação de células moderada- ou bem diferenciadas, com ausência de coilócitos. Os tipos verrucosos e basalóides compreendem os 20 a 35% restantes. São observadas em mulheres no período peri- ou pré menopausa e estão geralmente associadas a presença de neoplasias intraepiteliais vulvares (NIV). O CEC do tipo basalóide tem como característica o crescimento em faixas dentro de um estroma desmoplásico, com maturação citoplasmática focal e queratinização. Já o tipo verrucoso, apresenta projeções irregulares e queratinização proeminente (PINTO 2002; ALKATOUT et al. 2015).

O CEC de vulva é precedido de lesão precursora. Essas lesões, denominadas de neoplasia intraepitelial vulvar (NIV), são diagnosticadas através da vulvoscopia e biópsia da lesão suspeita (FUSCO 2010).

1.2.1 Neoplasia intraepitelial vulvar (NIV)

As neoplasias intraepiteliais vulvares (NIVs) se desenvolvem a partir de duas vias patogênicas distintas: uma associada ao HPV e a outra independente de HPV (Anexo 3).

Resumidamente, as NIVs clássicas/usuais correspondem a 90-98% das NIVs e ocorrem em pacientes por volta dos 30-50 anos. A taxa de progressão para carcinoma é baixa e o tempo de progressão é longo. Histologicamente tem aspecto basalóide, com freqüentes alterações coilocitóticas e disqueratose; a inflamação subepitelial é freqüente. É frequentemente relacionada ao HPV de alto risco, com expressão imunoistoquímica da proteína p16 e alto índice proliferativo indicado pelo Ki67 (HOEVENAARS et al. 2008; HORN et al. 2011).

As NIVs diferenciadas correspondem a 2-10% das NIVs, ocorrendo em pacientes com mediana ao redor dos 65 anos. A taxa de progressão para carcinoma é mais alta e em tempo mais curto. Acredita-se que o líquen escleroso e atrófico tenha papel patogênico no desenvolvimento desta lesão. Frequentemente o epitélio é de aspecto escamoso com queratinização. Esta via está relacionada a mutações no gene TP53, raramente tem ligação com o HPV e a expressão protéica de p16 é infreqüente, bem como é baixa a hiperexpressão do marcador de proliferação Ki67. A expressão protéica de p53 é freqüente neste tipo de NIV (PRETI et al. 2014). É de fundamental importância a identificação correta das vias patogênicas de NIV, uma vez que isto influencia na terapia e no prognóstico da doença (REGAUER e REICH 2013).

É relatado que 60% a 85% dos carcinomas invasores de vulva apresentam NIV adjacente ou carcinoma *in situ* prévio (BENEDET 2008; MOORE et al. 2009). Recomenda-se que, caso haja a presença de lesões associadas, como líquen escleroso e atrófico, hiperplasia escamosa e outras dermatoses, estas devam ser relatadas, bem como a existência de doença de Paget vulvar, uma vez que essas lesões podem ter contribuído para o desenvolvimento de NIV (REYES e COOPER 2014).

O líquen escleroso e atrófico (LEA) parece progredir para carcinoma vulvar em cerca de 2-5% dos casos. Em estudo recente foram reavaliados 61 casos de LEA sem evolução e 60 com evolução para carcinoma vulvar. Os autores relatam a dificuldade em se diferenciar, por vezes, essa lesão do NIV diferenciado. Assim, 25/60 (42%) dos casos com evolução para carcinoma foram reclassificados como NIV diferenciado nesse estudo (VAN DE NIEUWENHOF et al. 2011). Os casos que evoluíram para carcinoma, mas não apresentaram critério para NIV diferenciado mostraram, em relação aos LEA que não evoluíram para carcinoma, maior frequência de paraqueratose, disqueratose e hiperplasia com atipias da camada basal.

A antiga classificação proposta pela Sociedade Internacional para o Estudo da Doença Vulvar (ISSVD) em 1986 dividia NIV em graus I, II e III, levando-se em conta a proporção do epitélio que continha células atípicas (DEL PINO et al. 2013). Contudo, em 2004 essa classificação foi revista pela ISSVD, que propôs a categorização de acordo com a histopatologia da lesão e dividiu as NIV em tipos usual/clássica e diferenciada (FONSECA-

MOUTINHO 2008; HOEVENAARS et al. 2008; LANNEAU et al. 2009; REYES e COOPER 2014; PRETI 2015).

Do ponto de vista da proporção de células atípicas e espessura do epitélio que as apresentam, MEDEIROS et al. (2005) classificam as lesões em lesões intraepiteliais vulvares de baixo grau (condiloma exofítico, NIV tipo clássico com coilocitose, papiloma fibroepitelial, condiloma com feições de ceratose seborreica, condiloma plano e condiloma com apoptose proeminente). Esses autores consideram as lesões intraepiteliais vulvares como de alto grau as NIVs clássicas (categorizadas como II e III) e as NIVs diferenciadas.

1.2.2 Incidência e Etiopatogênese

Nos últimos anos tem ocorrido uma preocupação devido ao aumento na incidência de NIV. Diversos estudos relatam que a taxa desta doença dobrou nas últimas décadas e o mesmo não foi observado no carcinoma invasivo, que permaneceu estável. As taxas atuais de incidência relatados para NIV são ao redor de 1,2 por 100.000 mulheres, com pico de incidência entre 45 e 49 anos (FONSECA-MOUTINHO 2008; LANNEAU et al. 2009; NELSON e BOGLIATTO 2015).

Atualmente, os principais motivos do número crescente de casos de NIV devem-se ao aumento da prevalência de infecção por HPV e alterações nos hábitos sexuais. A prevalência global do HPV em NIV é de 80,4%, com predomínio do HPV 16. Dentre outros motivos que podem ter influência na incidência de NIV estão o tabagismo, o número de parceiros sexuais e uso

de contraceptivos orais. Apesar de haver chances de regressão espontânea, as lesões de NIV devem ser consideradas e tratadas como lesões pré-malignas (FONSECA-MOUTINHO 2008; PRETI et al. 2014; NELSON e BOGLIATTO 2015; PRETI 2015).

A NIV usual/clássica está relacionada com a infecção por HPV de alto risco e ocorre mais comumente em mulheres relativamente jovens. Os fatores de risco são semelhantes à neoplasia cervical no que diz respeito à presença do vírus, que estão relacionados com múltiplos parceiros sexuais, tabagismo, estado imunológico comprometido e idade jovem à primeira relação sexual. A doença é geralmente multifocal, multicêntrica e pode estar associada a outras neoplasias intraepiteliais do trato anogenital como a cervical, vaginal e anal. Embora em muitos casos ocorra a eliminação do vírus pelo sistema imunológico, em outros essa resposta pode ser insatisfatória e a presença do vírus pode resultar em alterações neoplásicas do trato anogenital (REYES e COOPER 2014; NELSON e BOGLIATTO 2015). Nessa via de NIV, o potencial maligno é raramente avaliado, uma vez que as lesões são removidas imediatamente ao diagnóstico para evitar que ocorra a progressão (PRETI 2015). Um estudo de revisão abordou 3322 casos de NIVs tratados e não tratados e mostrou que o risco de progressão de NIV não tratado para carcinoma invasivo é de 9%, enquanto para os casos tratados, o potencial maligno é de 3,3% (VAN SETERS et al. 2005).

A NIV diferenciada acomete mulheres mais velhas e está relacionada com danos genéticos oxidativos crônicos ocasionados por líquen escleroso. As alterações são menos específicas e apresentam histórico de prurido

variável e prolongado, sagração, dor, ardor, dispáreunia e secura na região. As lesões suspeitas geralmente são róseas ou em placas esbranquiçadas e mal demarcadas, podendo acometer regiões adjacentes. Essa via não apresenta associação com o HPV e mesmo com taxas inferiores a 2-5% de todas as lesões de NIV, oferecem maior risco de progressão para o carcinoma invasivo que a via relacionada ao HPV. O líquen escleroso também deve ser rigorosamente acompanhado, visto que pode evoluir para carcinoma escamoso (PRETI et al. 2014; NELSON e BOGLIATTO 2015).

1.2.3 Sinais, Sintomas e Tratamento

A aparência clínica das lesões de NIV é variável quanto à idade da paciente e cor da pele. As lesões geralmente acometem a região não pilificada, como clitóris, mas podem ocorrer em toda a região vulvar e perianal. O aspecto das lesões varia macroscopicamente, podendo se apresentar elevadas ou papulares. Podem ser pigmentadas, ulceradas e hiperqueratósicas (FONSECA-MOUTINHO 2008; CAMPION 2010).

Não existem sintomas específicos que possibilitem a identificação precisa de NIV, contudo os mais comuns são prurido, ardor e disúria. Esses sintomas podem perdurar por mais de dois anos. Há casos em que ocorre a formação de nódulo ou espessamento da pele, com alterações na pigmentação da lesão. Em outros casos, a doença pode mostrar-se silenciosa, sem nenhum sintoma evidente (FONSECA-MOUTINHO 2008; CAMPION 2010).

Dada a impossibilidade de prever a progressão da doença para invasão, recomenda-se o tratamento para todos os casos de NIV. Há diversas abordagens terapêuticas, como a excisão local, a ablação a laser e terapias medicamentosas. A ampla excisão local é recomendada em casos de suspeita de invasão. Os métodos utilizados visam remover as lesões evidentes para aliviar os sintomas e impedir o avanço da doença para invasão. Os tratamentos cirúrgicos podem ser realizados por excisão ou por laser de CO₂ (NELSON e BOGLIATTO 2015).

Uma abordagem terapêutica que tem se mostrado promissora em casos de NIV relacionada ao HPV, é o uso de um modulador da resposta imune com propriedades virais e antitumorais. Entretanto, o sucesso do tratamento depende de diversos fatores que podem influenciar os resultados, como a idade da paciente, o status do HPV e os efeitos adversos. Em casos de doença residual, é possível realizar a excisão local através de cirurgia (NELSON e BOGLIATTO 2015).

1.3 O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA VULVA (CEC)

1.3.1 Incidência

O carcinoma de células escamosas da vulva ocupa o quarto lugar dentre as neoplasias ginecológicas (WANG et al. 2008), correspondendo aproximadamente a 3-5% das neoplasias genitais femininas (VAN DE NIEUWENHOF et al. 2008). Seu aparecimento é mais comum após a menopausa, com média de idade de 70 anos no momento do diagnóstico (RODRIGUES et al. 2013). Apesar de ainda ser considerada uma doença rara, tem-se observado um aumento em sua incidência nas últimas décadas (ARAGONA et al. 2014), principalmente em mulheres jovens. Essa associação parece estar relacionada com o aumento de NIVs associadas à infecção pelo HPV (DE MELO MAIA et al. 2013a; WOELBER et al. 2013).

A incidência mundial dessa neoplasia é de 1-2/100.000 mulheres/ano, com o aumento dessa taxa para 20/100.00 mulheres/ano após os 75 anos (PINTO 2002; VAN DE NIEUWENHOF et al. 2011). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI)-*The Surveillance, Epidemiology, and End Results*-SEER, estimou 5150 novos casos para o ano de 2015, com 1080 mortes (National Cancer Institute-NCI 2015a).

No Brasil, no ano de 1992, uma pesquisa realizada pelo *Internacional Agency for Research on Cancer*-IARC mostrou que a cidade de Recife apresentava a maior incidência de carcinoma de vulva do mundo, com a taxa de 5,6 casos/100.00 mulheres por ano (International Agency for

Research on Cancer-IARC 1992). Entre os anos de 2000 a 2005, Recife ainda apresentava uma incidência elevada quando comparada a outras cidades do país. Entretanto, São Paulo tornou-se a cidade com grande número de mulheres acometidas com a doença nesse período: 1,44 casos/100.000 mulheres por ano. Estimativas brasileiras atuais não mostram claramente os dados a respeito desse tumor e, apesar do aumento observado nos últimos anos na incidência de câncer de vulva, a literatura ainda é limitada quanto à sua epidemiologia, com poucos estudos relatando a sua base populacional (BAANDRUP et al. 2011; DE MELO MAIA et al. 2013b).

Essa escassez de dados não ocorre somente no Brasil. Um estudo recente também relatou a falta de informações acerca da neoplasia vulvar em países Europeus e na América do Norte. O déficit de informações representa uma lacuna de dados para diversas regiões do mundo, tornando obscura a incidência específica da doença (WAGNER et al. 2015).

1.3.2 Sinais, Sintomas e Tratamento

Os sintomas mais comuns são prurido vulvar, ardor, corrimento vaginal, disúria, dor localizada, sangramento, nódulo ou ulceração e áreas da pele com cor e textura alteradas (TYRING 2003; STROUP et al. 2008; MAIA 2011). Dor à relação sexual também pode ocorrer. Além disso, os primeiros sintomas muitas vezes são ignorados pelas mulheres acometidas com essa neoplasia por constrangimento ou negação, o que provoca retardo na busca por atendimento médico. Essas questões comportamentais

prejudicam o diagnóstico precoce da doença. A conscientização tem fundamental importância visto que o diagnóstico em fases iniciais permite elevada chance de cura e abordagens terapêuticas mais conservadoras (VASQUEZ-CLARFIELD e DUFFY-WEISER 2010; ZWEIZIG et al. 2014).

O tratamento CEC de vulva é variado e inclui tratamentos tópicos, cirúrgicos, acompanhados por quimioterapia e radioterapia (TYRING 2003; WOELBER et al. 2013). Na década de 50, o método considerado padrão para os estágios iniciais da doença era a cirurgia, com ampla excisão local e associada à linfadenectomia inguinofemoral (DE MELO FERREIRA et al. 2012). Posteriormente, foi adotada a vulvectomy radical com ampla excisão local nas doenças estivessem em estágio inicial (MOORE et al. 2009). Contudo, esses procedimentos alteram a qualidade de vida das mulheres, uma vez que pode ocasionar morbidade, devido à técnica mutilante e desfigurante, ocasionando transtornos físicos, emocionais e sociais, além de distúrbios urinários e sexuais (DE MELO FERREIRA et al. 2012; LOCKHART et al. 2013).

A avaliação dos linfonodos inguinais representa um novo método diagnóstico, que viabilizou a transição das ressecções em bloco para as incisões inguinais (HACKER et al. 1981), assim como a biópsia do linfonodo sentinela nos pacientes selecionados (VAN DER ZEE et al. 2008). A realização desses procedimentos trouxe uma melhora significativa na sobrevida das pacientes em relação a outros métodos cirúrgicos disponíveis anteriormente (ANDERSEN e HACKER 1983; PODRATZ et al. 1983; MOORE et al. 2009).

Um estudo recente feito por BAIOCCHI e ROCHA (2015) abordou os conceitos atuais aplicados no tratamento do câncer de vulva. Eles relataram que a cirurgia é o método considerado padrão para o estadiamento e tratamento do carcinoma vulvar. Os tratamentos devem ser feitos de forma individualizada, uma vez que os estágios iniciais apresentam bom prognóstico. Em tumores primários a ressecção local ampla e radical pode ser adotada de forma segura, com margens cirúrgicas de dois centímetros e margem patológica final de pelo menos um centímetro. Em casos de lesão suspeita ou multifocal, a vulvectomy é o método mais indicado. Os pacientes com a doença unifocal, com tumor menor que quatro centímetros e virilha visível- e clinicamente negativa, deve ser adotado o procedimento de linfonodo sentinela com uma técnica combinada (corante “blue dye” e linfocintilografia). A linfadenectomia inguinofemoral sistemática é utilizada nos casos em que ocorre linfonodo ou linfonodo sentinela clinicamente positivo. A quimiorradiação neoadjuvante é indicada para os tumores que estão em estádios avançados ou para linfonodos inguinofemorais fixos aumentados.

Todos os efeitos mutilantes do tratamento convencional radical evidenciam a necessidade na busca de alternativas por métodos individualizados, o menos agressivo possível para cada caso, como por exemplo a imunoterapia (VAN DEN EINDEN et al. 2015).

1.3.3 Fatores de Prognóstico

Os fatores de prognóstico relacionados à doença incluem o estágio, tamanho do tumor, profundidade de invasão e a invasão do espaço vascular. Entretanto, o principal fator prognóstico é o status linfonodal (CANAVAN e COHEN 2002; DE JONG et al. 2012; BAIOCCHI et al. 2013; WOELBER et al. 2013).

O envolvimento linfonodal é correlacionado negativamente com a sobrevida da paciente (DE GREGORIO et al. 2013), pois pode ocorrer a disseminação da doença para os linfonodos regionais ou para sítios distantes (TABBAA et al. 2012). A incidência de nódulos linfáticos positivos na virilha é dependente do tamanho do tumor primário e da profundidade de invasão (VASQUEZ-CLARFIELD e DUFFY-WEISER 2010). Recentemente, o sistema de estadiamento FIGO (Anexo 4) foi revisto (VAN DER STEEN et al. 2010; GADDUCCI et al. 2012) e uma das alterações resultantes foi o agrupamento dos casos em que há ou não o envolvimento linfonodal, com prognósticos desfavorável e favorável, respectivamente (HACKER e BARLOW 2015). A dimensão das metástases faz parte dessa nova classificação, tendo-se adotado o seu diâmetro e padrão de crescimento (intra- ou extranodal) como importante fator de prognóstico (VAN DER STEEN et al. 2010; ARAGONA et al. 2014).

O estado patológico dos gânglios inguinais, bem como a disseminação para as estruturas adjacentes, determina a sobrevida da doença (NCI 2015b). Em pacientes com estágios iniciais, sem linfonodos comprometidos, a taxa de sobrevida é de 90% no período de cinco anos. Contudo, quando

há comprometimento linfonodal unilateral, a taxa de sobrevida atinge 60% e, se ocorrer positividade bilateral, os valores chegam a 20 - 30% em cinco anos (BAIOCCHI 2010). De acordo com dados de estadiamento da FIGO, a sobrevida em cinco anos para o estágio I é de 79% e diminui com o avanço da doença, com valores de 59% para o estágio II, 43% para o estágio III e 13% para o estágio IV (DE JONG et al. 2012).

Nas duas últimas décadas não foi observada melhora na sobrevida de pacientes com diagnóstico avançado ou recorrente da doença. De acordo com pesquisas recentes, aproximadamente um terço das pacientes com carcinoma vulvar são diagnosticadas em estádios FIGO III e IV, implicando em um mau prognóstico e menor tempo de sobrevida livre da doença (READE et al. 2014).

Em condições mais avançadas da doença, como a disseminação para sítios distantes ou para os linfonodos, o prognóstico apresenta-se muito ruim. Isso ocorre porque não há possibilidade de intervenção cirúrgica ou de radioterapia e recorrências são mais difíceis de tratar. Nesses casos, a taxa de sobrevida em 5 anos é inferior a 5% (ALKATOUT et al. 2015).

A ocorrência de metástases distantes é uma condição rara; contudo, o envolvimento linfonodal e a recorrência local podem apresentar consequências clínicas importantes no carcinoma vulvar. Dados da literatura mostram que há recorrência da doença em 40% dos casos, mesmo com uso de radio- e quimioterapia adjuvante. HOLTHOFF et al. (2015) demonstram que a recorrência tumoral parece estar associada com a invasão perineural, uma vez que a região perineural pode servir como proteção das células

tumorais ao sistema imune. O “escape” das células tumorais ao sistema imune permite seu crescimento recorrente e disseminação para outras estruturas, independente da ressecção do tumor primário (HOLTHOFF et al. 2015).

1.3.4 Etiologia e Patogênese

Atualmente, a incidência de CEC de vulva tem aumentado consideravelmente no grupo de mulheres jovens (JOURA et al. 2000; LANNEAU et al. 2009). De modo semelhante às vias de NIV, acredita-se na existência de duas vias etiopatogênicas distintas para o carcinoma invasivo (INSINGA et al. 2008) (Anexo 5). A primeira delas acomete mulheres jovens, que apresentam infecção principalmente por HPV e possuem hábito tabagista, que atuam como cofatores para o desenvolvimento da doença (INSINGA et al. 2008; LANNEAU et al. 2009). Um estudo com mais de 400 mulheres relatou a forte relação entre a infecção por HPV e o tabagismo e mostrou que 30% dessas mulheres haviam sido tratadas com câncer cervical invasivo ou pré-invasivo (JONES et al. 2005). Dentre os fatores de risco deste grupo também estão a idade jovem à primeira relação sexual, diversos parceiros sexuais ao longo da vida e a associação com o baixo nível socioeconômico (DUARTE-FRANCO e FRANCO 2014).

Já a segunda via ocorre em mulheres entre a sétima e oitava década de vida, e apresenta etiologia desconhecida, sendo três ou quatro vezes mais frequente do que a via que acomete mulheres jovens. Estes casos não possuem relação com o tabagismo ou com a infecção por HPV, mas têm

conexão com processos inflamatórios crônicos vulvares, como hiperplasia epitelial e, principalmente, com a presença de líquen escleroso, além da mutação do gene *TP53* (PINTO 2002; NOGUEIRA et al. 2006; HACKER 2009).

1.4 PAPEL DO PAPILOMAVIRUS HUMANO NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL

Os HPV pertencem à família *Papillomaviridae* e são compostos por 8000 pares de bases (pB) de moléculas de DNA circulares de fita dupla, não envelopados. São envoltos por um capsídeo de proteínas e possuem dois grupos funcionais de genes virais: *Late* “L” (genes tardios) e *Early* “E” (genes precoces) (BOCCARDO et al. 2010). Os genes tardios L1 e L2, são responsáveis por codificar as proteínas do capsídeo viral, e os genes precoces E1, E2, E4, E5, E6 e E7 regulam as fases do ciclo viral, incluindo processos de replicação do DNA e montagem do vírus na célula infectada (MUÑOZ et al. 2006; BOCCARDO et al. 2010).

A classificação do HPV é feita de acordo com o nicho biológico, posição filogenética e potencial de malignidade, podendo ser de baixo risco (tipos 6 11 13, 32, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 55 e 63) e de alto risco oncogênico (tipos 16 18, 31, 33 e 35) (MOLIJN et al. 2005; KNOPP et al. 2010).

A carcinogênese relacionada ao HPV é caracterizada pela degradação e inativação de proteínas supressoras tumorais, que são moléculas cruciais no controle do ciclo celular (MUÑOZ et al. 2006). As

oncoproteínas E6 e E7 interferem com as vias de regulação do ciclo celular no momento em que interagem genes supressores tumorais TP53 e retinoblastoma (Rb), respectivamente, resultando na inativação dessas vias, que levam à ausência de parada do ciclo celular e hiperproliferação das células infectadas (LAVORATO-ROCHA et al. 2013). Semelhante à carcinogênese cervical, no carcinoma de vulva a E7, ao inibir a pRb, regula positivamente a p14ARF, que também é um importante supressor tumoral. Da mesma forma, a E6, ao inibir a p53, leva a uma regulação positiva de p16INK4a. Essas regulações levam a uma superexpressão de p14 e p16 como consequência da infecção viral e sugerem que a degradação de p53 e pRb são eventos precoces na carcinogênese de vulva relacionados ao HPV (UEDA et al. 2011; LAVORATO-ROCHA et al. 2013). Dados na literatura relatam que pacientes relacionados a essa via de HPV apresentam melhor prognóstico, uma vez que a outra via envolve mutações somáticas em TP53 (LINDELL et al. 2010; TRIETSCH et al. 2015).

Do ponto de vista imunológico, a E6 é responsável ainda por ativar a telomerase, inibindo a senescência e morte celular, o que acarreta a imortalização das células. Já a E7, induz a expressão de IL-1 β , que ativa a expressão do modulador chave para a inflamação crônica em câncer, o NF- κ B (FERNANDES et al. 2015a).

O ciclo infeccioso do HPV utiliza uma estratégia em que a replicação e montagem do vírus ocorrem inteiramente em uma célula já destinada a apoptose, ou seja, na fase terminal de diferenciação dos queratinócitos. Não há citólise ou necrose decorrentes da replicação, montagem e liberação do

vírus e, portanto, nenhuma inflamação. Desta forma, durante o período do ciclo de infecção do HPV, ocorre pouca ou nenhuma liberação de citocinas pró-inflamatórias, importantes para a ativação de células dendríticas, para o meio e o vírus fica quase completamente invisível ao sistema imune de seu hospedeiro (STANLEY 2006, 2008). Ao mesmo tempo, estas células facilmente descamadas servem de veículos dos vírus durante o contato sexual, indo do infectante para o seu parceiro durante o contato pele-a-pele (STANLEY 2010).

As infecções por HPV podem ocorrer em todo o trato anogenital, principalmente no colo do útero, pênis, ânus e vulva, sendo associados constantemente aos HPVs de alto risco 16 e 18 (CHOW 2015). A infecção pelo HPV 16 é a mais comum nos cânceres vulvares (INSIGA et al. 2008; LINDELL et al. 2010). Na maioria das vezes, o vírus é eliminado naturalmente devido à ação eficaz da resposta imune. Contudo, aproximadamente 10% das mulheres desenvolvem uma infecção persistente que pode levar a lesões precursoras de alto grau e a carcinomas invasivos (HUSSAIN e HARRIS 2007). Esses HPVs de alto risco são importantes alvos para a pesquisa básica e clínica, que concentram esforços em estratégias terapêuticas, na triagem de pacientes e no desenvolvimento de vacinas (CHOW 2015). Dados da literatura mostraram que a vacina quadrivalente de HPV mostrou uma redução no número de mulheres com NIV usual, com eficácia de 79%, demonstrando a importância da vacinação de adolescentes como medida preventiva (CHOKOEVA et al. 2015).

A infecção persistente por HPV de alto risco é uma causa comprovada de muitos cânceres cervicais (WALBOOMERS et al. 1999). BUONOMO et al. (2011) relataram que cerca de 25 a 35% dos cânceres de cabeça e pescoço e orofaríngeos expressam os oncogenes de HPV de alto risco e isso também é observado em alguns tipos de câncer de pulmão. O mesmo foi demonstrado por PICANÇO-JUNIOR et al. (2014) e STIER et al. (2015), no carcinoma anal e adenocarcinoma colorretal, respectivamente, com prevalência de 80 a 90% dos casos com positividade para o HPV. Ainda há relatos de que 50-70% dos carcinomas vaginais também apresentam relação com o vírus (WAGNER et al. 2015).

Em indivíduos infectados pelo HPV, desencadeiam-se mecanismos antivirais e imunomoduladores poderosos, como a ativação de interferon (IFN) e produção de fator de necrose tumoral TNF e IL-1 (BOCCARDO et al. 2010). As células infectadas pelo HPV apresentam algumas características que a protegem da resposta imune, em uma parte dos indivíduos infectados. Primeiramente, o epitélio está distante de tecidos linfóides, como os linfonodos satélites. As células infectadas têm vida curta e descamam sem sofrer lise, reduzindo a chance de estimular uma resposta imune efetiva. Adicionalmente, o HPV inibe a expressão do receptor do tipo Toll-like-9 (TLR-9), que auxilia a ligação entre o HPV e as células dendríticas apresentadoras de antígeno intraepidérmicas. Inibe, ainda, a expressão de interferon, que é responsável pela ativação da resposta imune adaptativa, que destrói o vírus. A expressão destes receptores é responsável pela

migração das células dendríticas para os linfonodos (SANTEGOETS et al. 2008).

Além disso, foi demonstrado que em NIVs de alto grau é observada uma redução de células dendríticas e da expressão de CD1a no epitélio, sendo que o número destas células está inversamente relacionado com o estágio da doença. Esta diminuição seria resultado da migração dessas células para a derme, influenciadas por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e a IL-1. As células dendríticas apresentadoras de antígeno acumulam-se na derme e desencadeiam a migração de células NK, T CD4+, T CD8+ e CD25/HLA-DR+. Desta forma, as células dendríticas migram para os linfonodos regionais, estimuladas pelas quimiocinas, e disseminam a informação geradora de resposta imune à infecção pelo HPV (VAN SETERS et al. 2008). No entanto, nos casos em que ocorre a persistência da infecção e a transformação maligna, esses mecanismos estariam presentes de forma insuficiente para eliminação do agente, principalmente pela interferência na resposta imune do tipo Th1 (SANTEGOETS et al. 2008).

A estratégia viral que faz com o vírus não seja reconhecido pelo sistema imune é a questão central para que ocorra a infecção persistente e a progressão para uma neoplasia. De forma sintética, o mecanismo de evasão ocorre porque o HPV evita a resposta imune inata de modo eficaz e atrasa a ativação da resposta imune adaptativa. As células dendríticas do hospedeiro são expostas por um tempo prolongado a pequenas quantidades de proteínas virais em um meio que não há células inflamatórias. Como resultado disto, pode ser estabelecida uma ausência de resposta

imunológica local na mucosa infectada. O antígeno HPV-tolerantes neste meio torna as células do hospedeiro comprometidas e as células efetoras específicas do antígeno de HPV podem não ser recrutadas ou serem reguladas negativamente, ou ambos podem ocorrer concomitantemente. Desta forma, se durante a infecção persistente por HPV ocorrer a desregulação de E6 e E7 e o aumento da expressão destas proteínas e isto não desencadear uma resposta imune mediada por células efetoras, pode ocorrer a progressão a lesões intraepiteliais escamosas de alto grau e o carcinoma invasivo mediada pela ação do HPV (STANLEY 2006).

Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP) relacionados ao HPV 16, vários estudos têm demonstrado que a presença desse agente confere melhor prognóstico que nos casos de CCP não relacionados ao vírus. Ao avaliar a imunidade tumoral nestes tumores, mostrou-se que os pacientes apresentavam um predomínio de células T CD8+, que era responsável pelo melhor prognóstico. Assim, sugeriu-se que os pacientes HPV+ respondiam melhor a terapias, a radiação, ao destruir as células neoplásicas infectadas pelo vírus, exporia mais antígenos virais ao sistema imune do paciente, permitindo melhores resultados no combate ao tumor (ANDERSEN et al. 2014). Além disso, carcinomas de cabeça e pescoço podem expressar antígenos associados a tumores, como as próprias oncoproteínas virais E6 e E7, que são altamente antigênicas e desencadeiam respostas imunes antitumorais específicos (ALLEN et al. 2012). Nos tumores de vulva a maior parte dos estudos não relaciona a

presença do HPV de alto risco como fator independente de melhor sobrevida (ALONSO et al. 2011; DONG et al. 2015).

Embora o valor prognóstico da presença do HPV seja contraditório nos diversos tipos de cânceres a ele associado (orofaringe e vagina, com impacto prognóstico favorável *versus* vulva e pênis, sem impacto no prognóstico), o perfil imunofenotípico da inflamação relacionada ao tumor parece ter valor prognóstico em vários outros tipos de neoplasias (LANÇA e SILVA-SANTOS 2012; GALON et al. 2014; SHANG et al. 2015).

1.5 SISTEMA IMUNE E A PROGRESSÃO TUMORAL

Acredita-se que o desenvolvimento tumoral seja precedido por diversos eventos mutacionais cumulativos, fatores hereditários e ambientais. A ocorrência desta sucessão de eventos provoca, em um dado momento, a perda do controle celular de processos como diferenciação e divisão, acarretando a malignidade às células (VIOLA et al. 2004). Por sua vez, o sistema imune do hospedeiro evoluiu para proteger a homeostase tecidual e eliminar células danificadas e agentes infecciosos. A constante vigilância permite a identificação e destruição de células cancerosas, contudo, essa capacidade pode ser subvertida, levando a promoção e progressão do câncer (GRIVENNIKOV et al. 2011; NOY e POLLARD 2014). Nesse contexto, a inflamação é considerada um dos quatro marcos emergentes do câncer, no qual as células inflamatórias compõem grande parte do compartimento estromal dos tumores. Diversas evidências apontam para o

papel ativo que as células inflamatórias podem desempenhar na transformação neoplásica, em virtude de estas células terem a capacidade de promover a angiogênese, a proliferação das células neoplásicas e a invasividade (HANAHAHAN e WEINBERG 2011).

Dados epidemiológicos sugerem que cerca de 25% de todas as neoplasias ocorrem devido à inflamação crônica (TILI et al. 2013; FERNANDES et al. 2015b). A relação existente entre inflamação e câncer pode estar relacionada a duas vias distintas: a extrínseca, em que condições inflamatórias podem desencadear o perfil maligno e a intrínseca, na qual mutações dão origem a oncogenes, que criam um ambiente inflamatório em resposta a neoplasia (TILI et al. 2013). Além disso, eles participam de muitas redes reguladoras de genes cujas disfunções estão associadas a doenças humanas, inclusive o câncer (FERNANDES et al. 2015b).

Há indícios de que a ativação de diversas linhagens de células inflamatórias determina a evolução clínica da doença, evidenciando um valor de prognóstico. No entanto, pouco se sabe acerca do papel das células imunitárias e da resposta inflamatória no momento em que elas surgem pela primeira vez no tecido saudável e nos estágios iniciais do desenvolvimento da neoplasia. Ainda que as células saudáveis possam reconhecer células vizinhas que sejam aberrantes e eliminá-las sem precisar da ativação do sistema imune, as células da imunidade inata, primeira linha de defesa, podem identificar essas células pré-neoplásicas rapidamente (FENG e MARTIN 2015).

A resposta imunológica dada pela imunidade inata é rápida, porém pouco específica. Com isso, uma segunda resposta é gerada com grande especificidade, sendo esta denominada imunidade adaptativa. A resposta imune adaptativa oferece sinais para a ativação de linfócitos específicos para determinados antígenos, como os linfócitos T e B. As células T maduras apresentam receptores de células em suas superfícies que podem se diferenciar em co-receptores CD4 e CD8, de extrema importância na resposta a tumores (VIOLA et al. 2004).

Há evidências mostrando que a presença de linfócitos T e B infiltrantes, reconhecem os antígenos tumorais e apresentam um prognóstico favorável para pacientes que apresentam aumento dessas células ativadas. Outras evidências apontam que ocorre regressão espontânea de tumores devido ao aumento de células citotóxicas infiltradas, anticorpos e células T que reconhecem os antígenos tumorais (GRIVENNIKOV et al. 2011).

Dados da literatura demonstram que a infiltração de células imunes específicas em lesões neoplásicas constitui um fator prognóstico independente em vários tipos de tumores. Dentre estas células com importância clínica estão células CD4 T helper 1 (Th1) e CD8 (LANÇA e SILVA-SANTOS 2012; SENOVILLA et al. 2012). STERN et al. (2015) mostraram que, além dos papéis já conhecidos para células T CD4 e CD8, eles podem ser os principais efetores da resposta imunológica contra tumores.

As células T CD4 e CD8 são derivadas da mudança de expressão de proteínas de superfície celular do complexo CD3. Estas mudanças refletem o estado de maturação funcional das células, que se desenvolvem em duas populações funcionais distintas. O antígeno CD3 é, portanto, expresso em todas as células T e as células que expressam este marcador constituem uma mistura de células T, tanto auxiliares, como regulatórias e citotóxicas. Um estudo relatou que o aumento na densidade tanto de CD3, quanto de CD4 e CD8, diminuem o risco de recorrência no carcinoma cervical (NEDERGAARD et al. 2007). Outros autores também relataram a associação da resposta imune de CD3 com o bom prognóstico em câncer de pulmão e ovário (JOHNSON et al. 2000; ZHANG et al. 2003).

Os linfócitos B CD20, apesar de pouco estudados, também desempenham uma função importante no que diz respeito ao câncer: sua união com linfócitos T pode gerar respostas potentes de longo prazo contra o crescimento tumoral. Notavelmente, os tumores que apresentam CD8 e CD20 apresentam melhor sobrevida, o que sugere uma associação benéfica entre essas proteínas. Estudos mostram a associação entre células T CD8 e CD4 com CD20 relacionada com o aumento de sobrevida em câncer de pulmão. No câncer cervical, a associação dessas células apresenta uma menor taxa de recidiva (NELSON 2010). Além disto, CD20 é largamente utilizado como agente terapêutico na prática clínica para o tratamento de câncer administrados como anticorpos monoclonais (ZHOU e LEVITSKY 2012).

Os fatores FOX podem funcionar como ativadores ou inibidores de respostas, ao formar combinações com diferentes moléculas-alvo, como STAT3, Smad3 ou 4, ou ainda serem fosforilados diretamente por Akt e, portanto, contribuindo para a rota da PI3K. O grupo de KERDILES et al. (2010) desenvolveu duas linhagens de camundongos nocaute, uma para FOX1 e uma para FOXO3. Eles verificaram que os nocautes de FOX1 apenas em células T (cruzando camundongos CD4-Cre com FOXO1 -/-) possuem uma população expandida de células CD4⁺ de memória ou ativadas (CD44⁺) e desenvolvem autoimunidade mediada por hiperativação de linfócitos B, hipergamaglobulinemia e produção de autoanticorpos. Camundongos jovens com essa deleção condicional de FOX1 em células CD4⁺ exibiram um notável decréscimo na proporção e número de células T reguladoras (T_{reg}) FOXP3⁺ na população de células T CD4⁺ maduras no timo. Enquanto isso houve uma expansão de células CD4⁺ FOXP3⁺ nos órgãos linfóides periféricos. Contudo, essas células não foram funcionais *in vivo*, sugerindo que a autoimunidade associada com a deficiência de FOXO1 em células T CD4⁺ podia ser atribuída a função defeituosa de células T FOXP3⁺. Foi interessante que ao mesmo tempo em que a expressão de FOXP3 estava normal nas células T_{reg} FOXO1⁻, a expressão de outras moléculas associadas com T_{regs}, como CD25 e CTLA-4 estava marcadamente reduzida. Usando imunoprecipitação de cromatina, os autores demonstraram que FOX1 liga-se *upstream* à região de iniciação de transcrição do gene para CTLA-4, e que o elemento de ligação para FOXO1 era essencial para a expressão adequada de CTLA-4. Recentemente,

OUYANG et al. (2010) também reportaram que a deleção específica de FOX1 e 3 em células T levava ao desenvolvimento de doença inflamatória, em parte devido a defeitos funcionais em células T_{reg} FOXP3. Eles demonstraram que FOXO 1 e 3 ligam-se diretamente à região promotora de FOXP3 e seus genes alvo, e que FOXO 1 e 3 são essenciais para o controle apropriado da expressão de FOXP3. Ambos os estudos mostraram também que a não expressão de FOXO1 em T_{regs} leva à diminuição da função destas, e produz autoimunidade.

LODDENKEMPER et al. (2009) compararam as quantidades de células positivas para FOXP3 em carcinoma cervical com câncer de cólon, melanoma e brônquico e observaram que lesões associadas ao HPV apresentam um número significativamente maior de FOXP3 quando comparadas com os outros tipos estudados. Um estudo recente relatou o valor clínico da expressão de FOXP3 no infiltrado inflamatório relacionado ao carcinoma peniano. Neste tipo de carcinoma que, análogo à vulva, apresenta-se parcialmente relacionado ao HPV, a presença de número aumentado de células FOXP3 esteve independentemente associada a prognóstico desfavorável (VASSALLO et al. 2015).

Referências mais recentes mostraram que em subpopulações de células inflamatórias nas NIV diferenciadas encontrou-se quantidades semelhantes de células T no epitélio de pacientes e controles. Porém, dentre estas células, havia um número aumentado de células T regulatórias FOXP3 positivas nas pacientes em relação aos controles, tanto na epiderme, quanto na derme (VAN ESCH et al. 2015a). O reconhecimento dos mecanismos

imunes dessas lesões pode servir de base para um tratamento imunomodulador mais racional (PRETI 2015).

1.6 IMUNOTERAPIA

A utilização de proteínas, como anticorpos monoclonais, tem comprovado na prática clínica sua ação terapêutica valiosa para o tratamento de diversas neoplasias. Esta modalidade de tratamento, conhecida como imunoterapia, tem resultado em respostas clínicas eficientes e benefícios de sobrevida para muitos pacientes, uma vez que atua diretamente como alvo nas células cancerosas e exerce efeitos anti-tumorais (ZHOU e LEVITSKY 2012).

A imunoterapia tem representado, nas últimas décadas, a evolução de uma opção terapêutica promissora e confiável. Diversas aplicações de imunoterapia já são utilizadas na prática clínica com aprovação da *Food and Drug Administration*-FDA, Estados Unidos da América e da Agência Européia de medicamentos em pacientes com câncer. Outros estudos estão sendo realizados nessa linha para utilização da imunoterapia como intervenções terapêuticas independentes ou a ser combinado com tratamentos convencionais (GALLUZZI et al. 2014). A imunoterapia pode ser dividida em passiva ou ativa. Na forma passiva, é utilizada uma molécula efetora do sistema imune, que age diretamente contra o tumor. A forma ativa representa a indução da resposta imune do paciente contra o tumor (BARBUTO 2004).

A atividade antitumoral de grande parte das práticas de imunoterapia passiva depende também do sistema imunológico do hospedeiro, o que não reflete a complexidade da interação entre o tumor, a droga e o hospedeiro. Dessa forma, as abordagens imunoterapêuticas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade com o antígeno. As abordagens específicas são dirigidas contra determinados alvos tumorais, ao passo que as inespecíficas buscam elevar o sistema imune do paciente ao nível máximo de atividade, de modo que permita desencadear respostas efetoras eficazes no controle tumoral (BARBUTO 2004; GALLUZZI et al. 2014).

Os anticorpos monoclonais e as células T transferidas são as imunoterapias passivas mais promissoras e talvez, a abordagem mais amplamente utilizada, uma vez que são adotadas atividades antineoplásicas intrínsecas. Os anticorpos apresentam uma ligação tumor-alvo na qual alteram as funções de sinalização dos receptores expressos na superfície das células malignas; ligam-se e neutralizam os sinais tróficos produzidos pelas células tumorais; e reconhecem as células cancerosas de acordo com a expressão “antígeno associado a tumor” (TAA) (GALLUZZI et al. 2014).

Os antígenos tumorais são específicos para cada tipo de tumor. Devido a isto, imunoterapias-alvo precisam ser definidas para cada antígeno tumoral. Além disto, a identificação de biomarcadores acarretará benefícios para a predição de sobrevida das pacientes. De forma adicional ao uso de radio- e quimioterapia, os agentes direcionados desempenharão um papel importante no que diz respeito a um tratamento menos tóxico (KARLITEPE et al. 2015).

O câncer ginecológico apresentou elevada melhora nos tipos de tratamento nos últimos anos, contudo, muitas pacientes apresentam risco de recidiva e resistência às drogas emergentes. Novas abordagens são necessárias para obtenção de benefícios acerca do uso de terapias-alvo, como a redução dos efeitos adversos, a individualização e a busca do sucesso no tratamento de tumores sólidos nessa área. O emprego de anticorpos monoclonais representa a maioria das terapias direcionadas utilizadas até o momento, com benefícios comprovados para carcinoma colorretal, mama, cabeça e pescoço pulmão não pequenas células e de células renais. Os estudos na área ginecológica têm apresentado resultados animadores para o câncer de ovário (BELLATI et al. 2011). CHEN et al. (2015) confirmaram recentemente a eficácia da imunoterapia combinada com quimioterapia para o tratamento de câncer cervical . Até o momento as terapias alvo não foram investigadas em neoplasias ginecológicas malignas como vagina e vulva. A expectativa na inserção de terapias-alvo, como os anticorpos monoclonais, é a produção de efeitos secundários favoráveis com a modulação da resposta imune (BELLATI et al. 2011).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Dada a importância relativa do carcinoma vulvar em nosso país, em comparação com países industrializados, é desejável que ele seja mais intensamente estudado quanto a sua biologia, gerando dados que possam ser úteis na sua prevenção e tratamento. A imunoterapia tem se mostrado uma estratégia promissora em conjunto com formas tradicionais de tratamento do câncer e em várias outras neoplasias. Em nossa revisão da literatura, não encontramos estudos que visassem o melhor conhecimento da imunidade tumoral local em neoplasia vulvar. Assim, acreditamos ser desejável aprofundar a caracterização do infiltrado inflamatório tumoral nos carcinomas vulvares e suas lesões precursoras, para embasar futuros estudos que buscam a modulação da imunidade antineoplásica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre os componentes celulares do infiltrado inflamatório relacionados ao carcinoma vulvar e ao *status* de infecção pelo HPV e a sobrevida das pacientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Caracterizar o infiltrado inflamatório associado ao tumor em pacientes com carcinoma vulvar e com neoplasia intraepitelial vulvar, identificando os tipos celulares que o constituem e comparando-os nesses dois grupos;
- 2 Correlacionar a constituição celular do infiltrado inflamatório associado ao tumor em pacientes com carcinoma vulvar segundo o *status* do HPV;
- 3 Correlacionar a constituição celular do infiltrado inflamatório associado ao tumor em pacientes com carcinoma vulvar, com parâmetros clínico-patológicos.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram selecionadas retrospectivamente amostras de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina de pacientes que apresentaram diagnóstico de lesões intraepiteliais vulvares de baixo e alto grau, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo da vulva, com intervenção cirúrgica e/ou biópsia no A.C.Camargo Cancer Center, no período de 1980 a 2013. Todos os casos foram revisados por três patologistas (JV, MMS e LL) para confirmação diagnóstica. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas (CEP) da Instituição, processo nº 1918/14 (Anexo 1).

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os materiais degradados pela ação do tempo, insuficientes para as análises e aqueles que apresentaram informações clínicas incompletas foram excluídos. Ao final da seleção e após exclusão dos casos insuficientes, obteve-se um total de 110 casos: 21 com NIV de baixo grau, 45 com NIV de alto grau e 44 com carcinoma vulvar, sendo 40 do tipo escamoso, 4 do tipo basalóide e 1 do tipo verrucoso.

4.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos das pacientes foram coletados através da ferramenta *online* disponível para visualização de prontuários para pesquisa, H²TC e dos prontuários da Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos (SAME) do A.C.Camargo Cancer Center. Dentre os dados coletados estão: idade, *performance status*, tamanho do tumor, grau histológico, doenças associadas, *status* linfonodal, estadiamento, data de início do tratamento, recidiva, local da recidiva, sobrevida livre de doença e tempo de sobrevida.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM DO HPV

Para a detecção do DNA do HPV, foram extraídos DNA total a partir de até oito secções de tecido com 10mm de espessura para cada caso. As secções receberam um pré-tratamento com 350µL do tampão de lise ATL a partir do kit DNA FFPE (Qiagen, Valência, CA, EUA) adicionado diretamente às secções de parafina, seguido pela incubação por 20 minutos a 120°C com o tubo vedado. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 (Wilmington, DE, EUA) e foram posteriormente analisadas em um gel de agarose a 1%.

A detecção e tipagem do papilomavírus humano foram realizadas a partir do teste Linear Array HPV-genotyping test (Roche Molecular Systems; Branchburg, NJ, USA), que se baseia na amplificação do DNA alvo por PCR

utilizando iniciadores para mais de 37 tipos de HPV. A etapa seguinte consiste na hibridação dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas e a detecção dos produtos amplificados e ligados às sondas, através de determinação colorimétrica. O DNA amplificado desnaturado e uma matriz de sondas oligonucleotídicas foram utilizados para a detecção e determinação do genótipo, uma vez que permitem a identificação independente dos genótipos do HPV. A amplificação é capaz de detectar 37 tipos individuais de HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89 e IS39) e utiliza iniciadores biotinilados em uma região polimórfica conservada entre os diferentes tipos de HPV. A região L1 é a mais conservada do genoma do HPV e apresenta um comprimento de aproximadamente 45 pares de base (pB). Além disto, o ensaio inclui, como controle positivo para amostra de DNA amplificável, iniciadores da β -globina (150 pB) detectada na faixa de tipagem do HPV para proporcionar um controle de qualidade adequado. A amplificação das amostras de carcinoma vulvar foi realizada em uma reação contendo 50 μ L da amostra tumoral e 50 μ L de DNA polimerase AmpliTaq Gold na presença de Mg²⁺ contendo um excesso de deoxinucleosídeo 5'-trifosfatos (dNTPs) e iniciadores biotinilados para a amplificação das regiões específicas de HPV (450pB) e do gene da beta-globina (268pB). Além disso, é incluída na reação a utilização do trifosfato deoxiuridina (dUTP) e da enzima AmpErase uracil-N-glicosilase (UNG). As amostras foram mantidas em termociclador por 2min a 55°C para ação da enzima UNG com a finalidade de remover as bases uracil de

qualquer produto de amplificação contaminante existente na mistura de reação. Após esse período foi realizada a desnaturação da fita de DNA a 95°C por 9min e a reação foi submetida a 40 ciclos de 95°C por 30min, 55°C por 1min e 72°C por 1min. Foi realizado o aquecimento a 72°C por 5 min e após a amplificação foi acrescida ao produto uma solução de desnaturação, tornando as cadeias dos amplicons em fitas simples. O produto amplificado foi adicionado a bandejas contendo tiras de genotipagem revestidas com sondas dos diferentes tipos de HPV. Foram realizados os procedimentos de hibridação, lavagem e detecção de acordo com as especificações do fabricante e o resultado foi interpretado com o auxílio do Guia de Referência do Teste de Genotipagem *LINEAR ARRAY HPV*.

A tipagem do HPV foi realizada em 60% das amostras de neoplasia intraepitelial vulvar do presente estudo. Entretanto, não obtivemos sucesso no procedimento devido à elevada degradação e quantidades insuficientes de amostra. Desta forma, não foi dada continuidade nestes experimentos e, portanto, não serão abordados no presente trabalho. O mesmo procedimento foi utilizado para a tipagem do HPV nos carcinomas invasivos, cujos resultados foram coletados nos bancos de dados de nossos colaboradores (RODRIGUES et al. 2013).

4.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A avaliação morfológica do infiltrado inflamatório foi realizada em cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura, corados rotineiramente com hematoxilina-eosina (HE). A análise foi feita em microscópio óptico comum, no aumento de 400x. Nos casos que dispunham de cortes grandes foram selecionados 10 campos para análise; aqueles que não possuíam grande quantidade de material tiveram a quantidade máxima de campos contados. A avaliação foi realizada a partir da identificação visual de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos e o resultado foi semiquantificado em negativo, leve (50 células por campo de maior aumento), moderado (50-200 células por campo de maior aumento) e intenso (acima de 200 células por campo de maior aumento). Para análise estatística, foram consideradas as categorias agrupadas negativo+leve e moderado+intenso.

4.6 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações foram realizadas através do protocolo manual de imunohistoquímica, seguindo as recomendações dos fabricantes dos produtos utilizados. Foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura dos blocos referentes aos casos previamente selecionados e estes foram disposto em lâminas silanizadas StarFrost® (Light Labs, Dallas,

TX, USA). As etapas de desparafinização e recuperação antigênica foram realizadas sob alta pressão, através da panela elétrica Cuisinart® (Hampshire, UK), em solução apropriada para recuperação antigênica (Trilogy®, Cell Marque, Rocklin, CA, USA). As lâminas tiveram seus cortes incubados com os anticorpos primários de células inflamatórias selecionadas para esse estudo (**Tabela 1**).

Posteriormente, os cortes foram incubados com o kit HiDeF Detection HRP system® (Cell Marque) de amplificação para coelho/camundongo, seguidos de incubação com o polímero de detecção, ambos por dez minutos. Após a realização de lavagens em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina, DAB (Cell Marque). Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol e montadas através de equipamento automatizado Tissue-Tek® Prisma®/Film® (SAKURA FINETEK, Torrance, CA, USA). As lâminas tiveram seus cortes digitalizados no equipamento digitalizador de imagens APERIO® (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA). Previamente ao início das reações, todos os anticorpos selecionados para o estudo foram padronizados para seleção da melhor diluição.

Tabela 1 - Anticorpos primários, clones, fabricantes, diluições e padrões de marcação utilizados nas reações de imunoistoquímica

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Padrão de marcação	pH
CD3 Pan-linfócito T	SP7 / Monoclonal de coelho	Abcam®	1:100	Membrana	Neutro
CD4 Linfócito T <i>helper</i>	EPR685 / Monoclonal de coelho	Abcam®	1:400	Membrana	Neutro
CD8 Linfócito T citotóxico	EP1150Y / Monoclonal de coelho	Abcam®	1:800	Membrana	Neutro
CD20 Pan-linfócito B	EP459Y / Monoclonal de coelho	Abcam®	1:400	Membrana	Neutro
FOXP3 Linfócito T regulador	Policlonal de coelho	Bio SB®	1:50	Núcleo	Neutro

Legenda: Abcam (Cambridge, MA, USA); Bio SB (Santa Barbara, CA, USA).

4.7 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas foram digitalizadas no aumento de 40x através do aparelho digitalizador de lâminas APERIO® (Leica Biosystems). Em seguida, foi realizada a avaliação da reação de imunoistoquímica de forma automatizada pelo programa de patologia digital ImageScope® (Scope, APERIO®, Leica Biosystems). Esta ferramenta procede a análise das imagens a partir da seleção dos campos representativos da neoplasia e do carcinoma, determinadas pelo pesquisador.

Para a avaliação, foram utilizados os algoritmos do programa para os padrões de marcação exigidos por cada proteína. Desta forma, foi utilizado o algoritmo de marcação nuclear “IHC nuclear®” para FOXP3 e o algoritmo de marcação de membrana “Membrane®” para CD3, CD4, CD8 e CD20, o qual

determinou a intensidade de marcação e a porcentagem de células marcadas em cada caso.

Foram determinadas cinco regiões *hot spots* aleatoriamente para análise em áreas adjacentes à lesão em NIVs e cinco regiões peri e intratumorais *hot spots* para CAI. O padrão de expressão foi avaliado de forma quantitativa, em que os níveis de expressão foram representados através do produto entre a porcentagem de células positivas e a intensidade de imunomarcação, ambos os valores fornecidos pelo Aperio:

HSCORE= $\Sigma(i \times P_i)$, em que P_i = porcentagem de pixels positivos, variando de 0 a 100% e a intensidade da coloração do pixel $i = 0$ 1 (fraco) 2 (moderado) ou 3 (intenso)

O resultado final compreende a faixa entre 0 e 300 (ALVARENGA et al. 2013). Ao final, para os cálculos estatísticos e de sobrevida, esses valores foram binarizados, sendo o ponto de corte o valor da mediana para aquele parâmetro. Assim, valores menores que as medianas foram consideradas “baixa expressão” (ou negativo/fraco) e valores iguais ou acima da mediana foram considerados “alta expressão” (ou moderado/intenso).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através dos softwares “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 18.0 e o “*GraphPad PRISM*” (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA) versão 5.0. Foi utilizado o teste do qui-quadrado para verificar associações entre variáveis categóricas ou teste exato de Fisher para amostras pequenas. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para verificar associações entre duas variáveis contínuas, ou teste de Kruskal-Wallis para verificar associações entre três ou mais variáveis contínuas. O teste de variância ANOVA com correção de Bonferroni foi adotado para a comparação de três ou mais grupos com distribuição normal e não pareados. A determinação das sobrevidas foi realizada a partir da curva de Kaplan-Meier. O teste de Log-Rank foi adotado para testar a significância das diferenças entre as funções de sobrevida. As associações que apresentassem valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DAS PACIENTES

Os quatro grupos avaliados no presente estudo foram constituídos por 21 pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau (NIV BG), 45 com neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau (NIV AG) e 44 com carcinoma invasivo (CAI). A média, o desvio padrão, a mediana e a variação de idade são mostrados na **Tabela 2**. Grande parte das pacientes de NIV BG e AG corresponde a mulheres mais jovens, com média de idade de 40 e 44,8 anos, respectivamente. Já o grupo de pacientes com CAI era composto por mulheres mais velhas, cuja média de idade corresponde a 69,5 anos.

Tabela 2 - Média, desvio padrão, mediana e variação de idade (em anos) de acordo com os tipos histológicos

Tipo histológico	Média	Desvio Padrão	Mediana	Variação de idade
NIV BG	40	18,77	39	21 - 81
NIV AG	44,8	16,88	43	17 - 80
CAI I / CAI P	69,5	14,40	71	39 - 98

Legendas: NIV BG = neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau; NIV AG = neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau; CAI = carcinoma invasivo.

A **Tabela 3** apresenta as características demográficas e comportamentais das pacientes com NIV (BG e AG). Observamos que houve um predomínio de pacientes com hábitos etilistas, não tabagistas e que não apresentavam doenças secundárias. As demais variáveis não

apresentaram associação significativa entre os grupos estudados.

A tipagem para HPV pelo *Linear Array* foi tentada para os casos de NIV, porém sem sucesso. Não houve quantidade suficiente de DNA para as análises.

Na **Tabela 4** estão apresentados dados obtidos da análise dos parâmetros clinico-patológicos do grupo de pacientes com CAI. A tipagem para HPV pelo *linear array* mostrou que 25 casos não apresentavam o vírus, três casos apresentavam HPV de baixo risco (tipos 42, 54), três casos apresentavam HPV de risco desconhecido (tipos 67, 69, 84). Em 22 casos foram detectados HPVs de alto risco oncogênico (tipos 16 [8 casos], 18 [2], 31 [1], 33 [6], 35 [2], 53 [2] e 82 [1]; em 5 casos havia mais de um tipo de HPV de alto risco). Não foi encontrada associação entre as características clinico-patológicas avaliadas e a positividade para o HPV.

Tabela 3 - Características demográficas e comportamentais em neoplasias intraepiteliais vulvares.

Histologia	Variável	Categoria	Número de casos N total (%)
NIV BG	Idade	<46 anos	14/21 (66,7)
		46-49 anos	1/21 (4,7)
		>50 anos	3/21 (14,3)
		Não informado	3/21 (14,3)
	Tabagismo	Sim	5/11 (45,5)
		Não	6/11 (54,5)
	Etilismo	Sim	3/6 (50)
		Não	3/6 (50)
	Doenças associadas	DSI	0/21 (0)
		NIC	3/21 (14,28)
		NIVA	2/21 (9,52)
		Outras doenças/mais de uma doença	2/21(9,52)
		Sem doenças associadas	14/21 (66,66)
NIV AG	Idade	<46 anos	25/45 (55,5)
		46-49 anos	4/45 (8,9)
		>50 anos	15/45 (33,3)
		Não informado	1/45 (2,3)
	Tabagismo	Sim	9/27 (33,3)
		Não	18/27 (66,7)
	Etilismo	Sim	16/25 (64)
		Não	9/25 (36)
	Doenças Associadas	DSI	5/45 (11,11)
		NIC	5/45 (11,11)
		NIVA	2/45 (4,44)
		Outras doenças/ mais de uma doença	6/45 (13,33)
		Sem doenças associadas	27/45 (60,0)

Legenda: **NIV BG** = neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau; **NIV AG** = neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau; **DSI**= doenças do sistema imune (linfoma e HIV); **NIC**= Neoplasia intraepitelial cervical; **NIVA**= Neoplasia intraepitelial vaginal; **Outras doenças** = Carcinoma espinocelular pulmonar; Neoplasia intraepitelial do períneo; carcinoma espinocelular de endométrio; Tumor sigmoide e Adenoma do colo uterino.

Tabela 4 - Características clínico-patológicas e infecção por HPV em carcinomas invasivos vulvares.

Características clínico-patológicas	Categoria	Valor de N/Total (%)	N HPV positivo/total HPV positivo (%)
CEC	Idade (MÍN – MÁX)		
Bem diferenciado	55 - 87	16/44 (36,3)	7/19 (36,8)
Moderadamente diferenciado	56 - 84	18/44 (41)	6/19 (31,6)
Pouco diferenciado	48 - 78	6/44 (13,6)	4/19 (21,1)
Basalóide	39 - 98	3/44 (6,8)	2/19 (10,5)
Verrucoso	Não informado	1/44 (2,3)	0/19 (0)
Tabagismo	Sim	7/38 (18,4)	6/19 (31,6)
	Não	31/38 (81,6)	13/19 (68,4)
Etilismo	Sim	0/37(0)	0/19 (0)
	Não	37/37 (100)	19/19 (100)
Profundidade de invasão	Derme superficial e média	20/42 (47,61)	10/19 (52,6)
	Derme profunda e subcutânea	22/42 (52,38)	9/19 (47,4)
Invasão vascular	Sim	8/40 (20,0)	4/17 (23,5)
	Não	32/40 (80,0)	13/17 (76,5)
Invasão perineural	Sim	7/40 (17,5)	3/18 (16,7)
	Não	33/40 (82,5)	15/18 (83,3)
Metástase linfonodal	Sim	10/24 (41,66)	4/10 (40)
	Não	14/24 (58,33)	6/10 (60)
Doenças Associadas	NIV	3/12 (25,0)	2/5 (40)
	LEA, acantose e Carcinoma in situ	9/12 (75,0)	3/5 (60)
Estadiamento FIGO	I e II	25/42 (59,52)	10/17 (58,8)
	III e IV	17/42 (40,47)	7/17(41,2)

Legendas: MÍN = mínimo; MÁX = máximo; NIV = neoplasia intraepitelial vulvar; LEA = líquen escleroso e atrófico

5.2 MORFOLOGIA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NO CARCINOMA VULVAR

Os dados sobre o infiltrado inflamatório identificado nos pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar e carcinoma invasivo estão sumarizados na **Tabela 5**. Nesta, foram incluídos separadamente os dados do infiltrado intra- e peritumoral nos carcinomas invasores. Foi observada a presença de infiltrado linfocitário moderado a intenso na maior parte dos casos. Entretanto, neutrófilos e eosinófilos se apresentaram menos evidentes em todos os grupos; assim, foram excluídos das análises estatísticas subsequentes. Encontramos um aumento significativo do número de plasmócitos ($p=0,026$) à medida que ocorria a progressão da doença (de lesão precursora à carcinoma invasivo). Neste caso, o aumento nos CAI foi evidente tanto na região peri- quanto na intratumoral.

Tabela 5 - Avaliação visual das células inflamatórias no estroma de neoplasias intraepiteliais vulvares e do carcinoma invasivo (regiões intra- e peritumoral)

Células inflamatórias	Categoria	NIV BG N / N total (%)	NIV AG N / N total (%)	CAI P N / N total (%)	CAI I N / N total (%)	p
Linfócitos	0	8/21 (38,1)	10/45 (22,2)	1/39 (2,5)	11/44 (25)	0,053
	1	13/21 (61,9)	35/45 (77,8)	38/39 (97,5)	33/44 (75)	
Plasmócitos	0	19/21 (90,5)	36/45 (80)	26/39 (66,7)	26/44 (59,1)	0,026*
	1	2/21 (9,5)	9/45 (20)	13/39 (33,3)	18/44 (40,9)	
Neutrófilos	0	21/21 (100)	44/45 (97,8)	37/39 (94,9)	42/44 (95,5)	0,6939
	1	0/21 (0)	1/45 (2,2)	2/39 (5,1)	2/44 (4,5)	
Eosinófilos	0	21/21(100)	45/45 (100)	37/39 (94,9)	44/44 (100)	0,1275
	1	0/21 (0)	0/45 (0)	2/39 (5,1)	0/44 (0)	

Legendas: NIV BG = neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau; NIV AG = neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau; CAI P = carcinoma invasivo - região peritumoral; CAI I = carcinoma invasivo - região intratumoral; 0 = infiltrado ausente/leve (até 50 células por campo de maior aumento, 400x); 1 = infiltrado moderado/intenso (51 ou mais células por campo de maior aumento, 400x). * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

As células inflamatórias foram individualmente avaliadas em relação às variáveis clínico-patológicas em NIV BG e AG e os dados estão demonstradas na **Tabela 6**. Não houve associação significativa entre o infiltrado linfocitário e plasmocitário com o tabagismo, etilismo, doenças associadas em NIV BG e AG.

No grupo dos CAI, os dados estão mostrados na **Tabela 7**. Os dados referentes ao infiltrado linfoplasmocitário peritumoral não mostraram associação significativa com os parâmetros clínico-patológicos. Em relação ao infiltrado intratumoral, identificamos uma associação estatisticamente significativa entre a diminuição do número de linfócitos e a presença de invasão de derme profunda e subcutânea ($p=0,010$) e invasão vascular ($p=0,008$), respectivamente. Pacientes com baixo número de plasmócitos apresentavam significativamente presença de metástase linfonodal ($p=0,033$) e doenças associadas, como carcinoma in situ, acantose, líquen escleroso e atrófico ou mais de uma doença ($p=0,018$).

Tabela 6 - Características clínico-patológicas associadas às células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos *) em neoplasia intraepitelial vulvar

Histologia	Variável	Categoria	Linfócito	p	Plasmócito	p
NIV BG	Tabagismo	0	4/8	1,000	1/2	1,000
		1	4/8		1/2	
	Etilismo	0	3/5	1,000	1/1	1,000
		1	2/5		0/1	
	Doenças Associadas	A	1/5	0,641	0/1	0,565
		B	-		-	
		C	-		-	
		D	2/5		1/1	
		E	2/5		0/1	
NIV AG	Tabagismo	0	8/24	1,000	2/6	1,000
		1	16/24		4/6	
	Etilismo	0	14/23	0,520	5/6	0,364
		1	9/23		1/6	
	Doenças Associadas	A	5/19	0,507	1/5	0,833
		B	4/19		1/5	
		C	-		-	
		D	9/19		3/5	
		E	1/19		0/5	

Legendas: NIV BG = neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau; NIV AG = neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau; Tabagismo: **0** = Não; **1** = Sim. Etilismo: **0** = Não; **1** = Sim. Doenças associadas: **A** = DSI (doenças do sistema imune); **B** = NIC (neoplasia intraepitelial cervical); **C** = NIVA (neoplasia intraepitelial vaginal); **D** = Outras doenças/mais de uma doença; **E** = Sem doenças associadas. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$. ** Não estão incluídos os dados de eosinófilos e neutrófilos, pois, segundo os critérios de corte, maior parte dos casos foi negativa.

Tabela 7 - Características clínico-patológicas associadas as células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos *) em carcinoma invasivo

Região	Variável	Categoria	Linfócito	p	Plasmócito	p
CAI P	HPV	0	24/38	0,385	1/5	0,118
		1	14/38		4/5	
	Tabagismo	0	28/32	1,000	24/29	0,295
		1	4/32		5/29	
	Etilismo	0	32/32	-	8/8	-
		1	0/32		0/8	
	Profundidade de invasão	0	17/36	1,000	3/5	1,000
		1	19/36		2/5	
	Invasão vascular	0	27/34	1,000	4/5	1,000
		1	7/34		1/5	
	Invasão Perineural	0	28/34	1,000	4/5	1,000
		1	6/34		1/5	
	Metástase Linfonodal	0	12/21	-	2/3	1,000
		1	9/21		1/3	
CAI I	Doenças associadas	0	2/11	-	1/1	0,200
		1	9/11		0/1	
	Estadiamento FIGO	0	22/36	1,000	2/5	0,593
		1	14/36		3/5	
	HPV	0	17/36	0,301	9/18	0,542
		1	16/36		9/18	
	Tabagismo	0	7/9	1,000	12/16	0,425
		1	2/9		4/16	
	Etilismo	0	28/28	-	15/15	-
		1	0/28		0/15	
	Profundidade de invasão	0	19/32	0,010*	11/17	0,115
		1	13/32		6/17	
	Invasão vascular	0	28/31	0,008*	16/17	0,107
		1	3/31		1/17	
	Invasão perineural	0	29/33	0,088	17/18	0,105
		1	4/33		1/18	
	Metástase linfonodal	0	12/18	0,192	8/9	0,033*
		1	6/18		1/9	
	Doenças associadas	0	2/7	1,000	3/4	0,018*
		1	5/7		1/4	
	Estadiamento FIGO	0	20/32	0,714	13/17	0,109
		1	12/32		4/17	

Legendas: CAI P = carcinoma invasivo peritumoral; CAI I = carcinoma invasivo intratumoral. HPV: **0** = Não; **1** = Sim. Tabagismo: **0** = Não; **1** = Sim. Etilismo: **0** = Não; **1** = Sim. Profundidade de invasão: **0** = Derme superficial e média; **1** = Derme profunda e subcutânea. Invasão Vascular: **0** = Ausente; **1** = Presente. Invasão Perineural: **0** = Ausente; **1** = Presente. Metástase Linfonodal: **0** = Ausente; **1** = Presente. Doenças associadas: **0** = NIV BG, NIV AG, NIV clássico ou apenas uma doença; **1** = CA in situ, acantose, líquen escleroso e atrófico ou mais de uma doença; Estadiamento FIGO: **0** = I e II; **1** = III e IV. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$. **Não estão incluídos os dados de eosinófilos e neutrófilos, pois, segundo os critérios de corte, maior parte dos casos foram negativos.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES LINFÓIDES (CD3, CD4, CD8, CD20 E FOXP3) NAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS VULVARES E CARCINOMA INVASOR DA VULVA

As medianas dos valores de expressão dos marcadores linfóides obtidos em cada grupo de estudo estão apresentadas na **Tabela 8**. Houve aumento do sinal das células inflamatórias ao longo da progressão da doença em NIV BG, NIV AG e CAI P para CD3, CD8 e FOXP3 e um decréscimo do sinal para CD4. Para CD20 não houve tendência de aumento contínuo. O sinal de células inflamatórias no CAI I foi nitidamente menor que no CAI P em todos os marcadores.

Tabela 8 - Valores medianos da expressão moderada/forte dos marcadores linfóides em neoplasia intraepitelial vulvar e no carcinoma invasivo da vulva

	CD3	CD4	CD8	CD20	FOXP3
NIV BG	120,3 (42,4 - 226)	192,9 (97,3 - 259,4)	115,7 (76,6 - 252,6)	61,8 (3,05 - 168,5)	16,6 (0,20 - 157,8)
NIV AG	133,8 (42,1 - 243,1)	138,2 (29,4 - 242,8)	150,9 (42,6 - 256,2)	83,6 (1,42 - 244,7)	22,4 (0,15 - 96,7)
CAI P	147,5 (72,8 - 248,4)	116,4 (17,2 - 219,1)	175,1 (51,9 - 247,5)	74,1 (2,44 - 242)	39,6 (0,84 - 114,3)
CAI I	40,1 (0,64 - 166,8)	26,3 (0 - 177,4)	108,4 (0,96 - 198,2)	1,58 (0 - 34,9)	5,17 (0,15 - 47,8)

Legendas: **NIV BG:** Neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau; **NIV AG:** Neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau; **CAI P:** carcinoma invasivo na região peritumoral; **CAI I:** Carcinoma invasivo na região intratumoral. N total de casos: 21 NIV BG, 45 NIV e 44 CAI.

Na **Figura 2**, estão apresentadas as comparações entre os valores das medianas e das respectivas associações estatísticas entre as histologias de cada marcador nos grupos estudados. Em CD3 (**Figura 2A**), CD8 (**Figura 2C**) e FOXP3 (**Figura 2E**), ocorre o aumento da expressão proteica desde as lesões precursoras (NIV BG e AG) até CAI P. Um aumento menos acentuado é observado em CAI I. Em CD4 (**Figura 2B**), há uma diminuição na expressão do marcador à medida que ocorre a progressão da neoplasia. Já em CD20 (**Figura 2C**), ocorre um aumento discreto na expressão destas células inflamatórias.

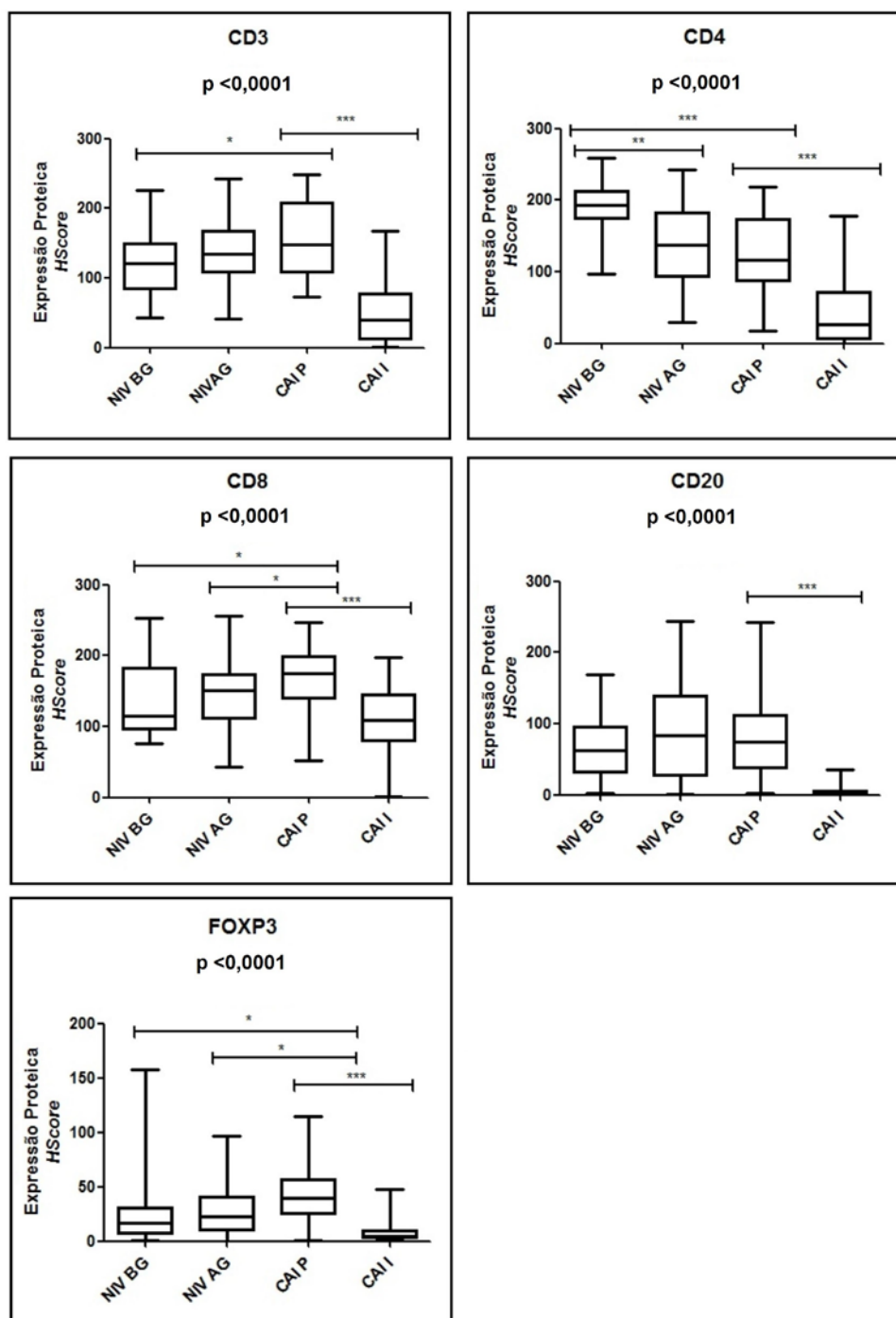


Figura 2 – Expressão dos marcadores entre os grupos de neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau (NIV BG), neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau (NIV AG), carcinoma invasivo intratumoral (CAI I) e carcinoma invasivo peritumoral (CAI P).

(A) CD3, (B) CD4, (C) CD8, (D) CD20 e (E) FOXP3. *: p<0,05; **: p<0,001; ***: p<0,0001.

Nas **Figuras 3 e 4** estão apresentados exemplos de marcação dos antígenos linfóides nos casos de NIV e a comparação das expressões entre NIV BG vs. NIV AG (**Figura 3**) e CAI P vs. CAI e CAI (**Figura 4**). Em NIV, apenas CD4 apresentou associação significativa entre as expressões de NIV BG e AG ($p=0,0005$) (**Figura 3F**). Já em CAI, todos os marcadores tiveram associação estatística entre as expressões de CAI P e CAI I ($p<0,0001$) (**Figura 4C, 4F, 4I, 4L, 4O**)

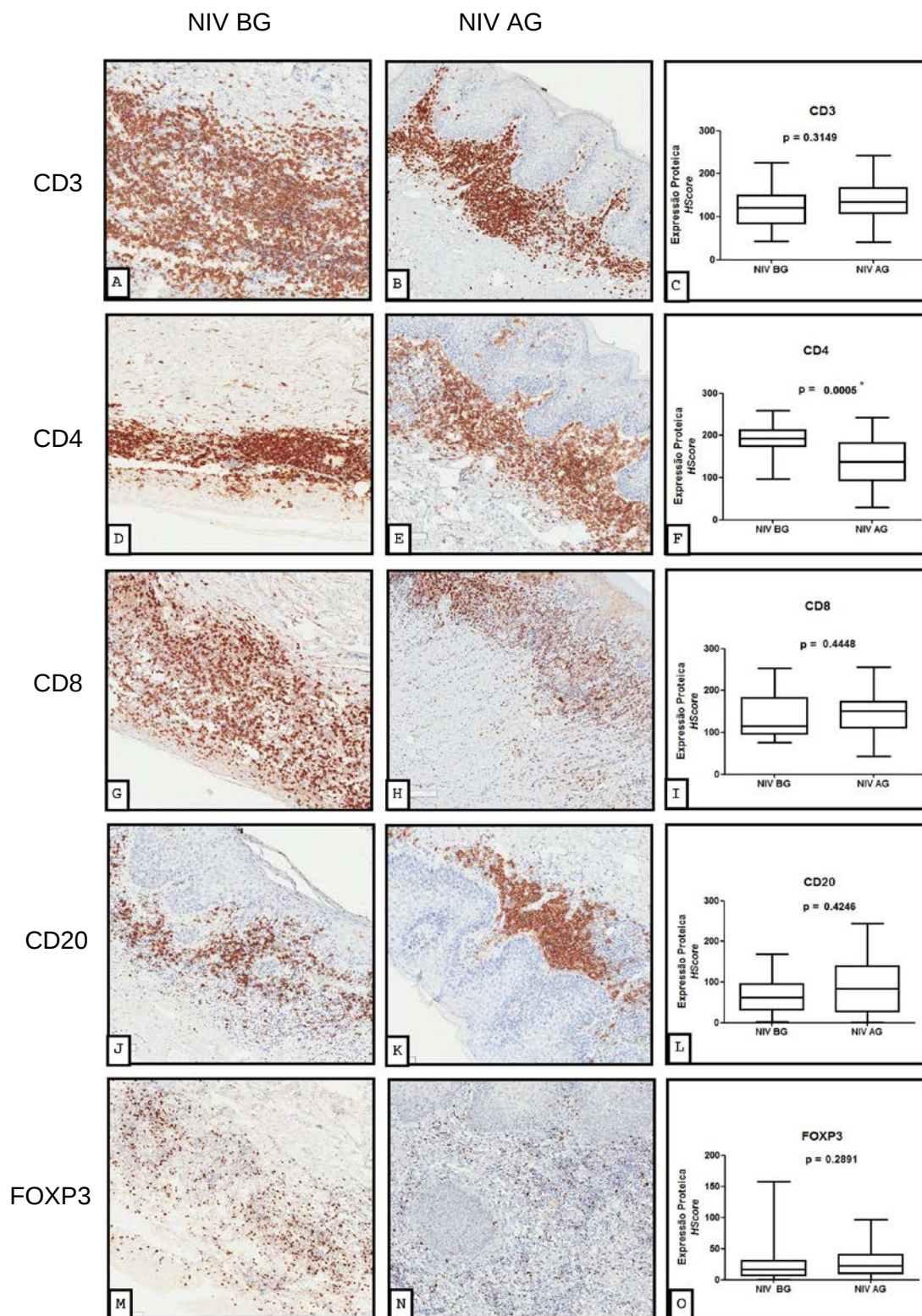


Figura 3 - Marcação imunoistoquímica de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 em neoplasia intraepitelial vulvar. CD3 em (A) NIV BG, (B) NIV AG e a comparação entre a expressão total em NIV BG e AG; CD4 em (D) NIV BG, (E) NIV AG e (F) comparação entre a expressão total em NIV BG e AG; CD8 em (G) NIV BG, (H) NIV AG e (I): Porcentagem de expressão total de CD8 em NIV BG e AG; CD20 em (J) NIV BG, (K) NIV AG e (L) expressão total em NIV BG e AG; FOXP3 em (M) NIV BG; (N) NIV AG e (O) expressão total de FOXP3 em NIV BG e AG. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$. [Neoplasia intraepitelial de baixo e alto grau= NIV BG e NIV AG]

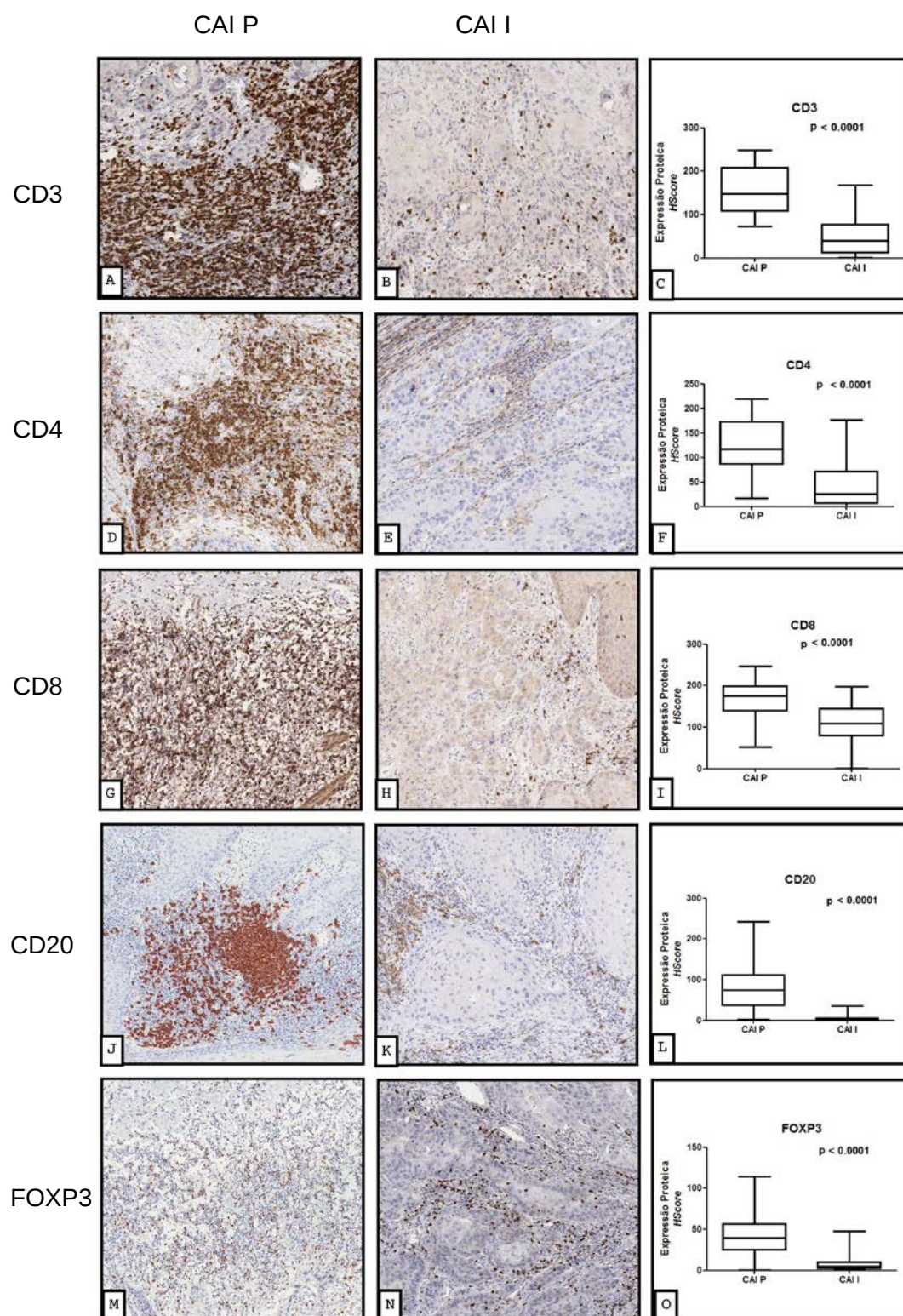


Figura 4 - Marcação imunoistoquímica de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 em carcinoma invasivo da vulva. CD3 em (A) CAI I, (B) CAI P e a comparação entre a expressão total em CAI I e CAI P; CD4 em (D) CAI I, (E) CAI P e (F) comparação entre a expressão total em CAI I e CAI P; CD8 em (G) CAI I, (H) CAI P e (I) Porcentagem de expressão total de CD8 em CAI I e CAI P; CD20 em (J) CAI I, (K) CAI P e (L) expressão total em CAI I e CAI P; FOXP3 em (M) CAI I; (N) CAI P e (O) expressão total de FOXP3 em CAI I e CAI P. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$. [Carcinoma invasor da vulva, região intratumoral e peritumoral= CAI-I e CAI-P].

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES LINFÓIDES (CD3, CD4, CD8, CD20 E FOXP3) NAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS VULVARES E CARCINOMA INVASOR DA VULVA EM RELAÇÃO AOS DADOS DEMOGRÁFICOS E CLINICOPATOLÓGICOS

Nos casos de NIV AG, foi observada associação significativa entre a diminuição da expressão de CD3 e o etilismo ($p=0,038$). Já o aumento de CD8 esteve associado com a presença de doenças associadas ($p=0,036$). No entanto, não houve associação significativamente estatística entre os outros marcadores e às demais características demográficas e comportamentais em NIV BG e AG. (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Associações entre a expressão moderada/forte de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 e os dados demográficos nas neoplasias intraepiteliais vulvares

	Variáveis	Categoria	CD3 N/Total	p	CD4 N/Total	p	CD8 N/Total	p	CD20 N/Total	p	FOXP3 N/Total	p
NIV BG	Tabagismo	0	4/9	0,584	3/7	1,000	2/7	0,584	3/8	0,100	2/8	0,584
		1	5/9		4/7		5/7		5/8		6/8	
	Etilismo	0	3/5	0,275	2/4	0,513	2/4	0,275	3/6	0,513	2/5	0,513
		1	2/5		2/4		2/4		3/6		3/5	
	Doenças associadas	A	1/3	0,646	0/4	0,646	0/4	0,953	1/4	0,953	1/4	0,499
		B	0/3		0/4		0/4		0/4		0/4	
		C	0/3		0/4		0/4		0/4		0/4	
		D	1/3		3/4		2/4		2/4		2/4	
		E	1/3		1/4		2/4		1/4		1/4	
NIV AG	Tabagismo	0	7/16	0,123	6/14	0,918	7/15	0,064	4/13	0,758	5/13	0,959
		1	9/16		8/14		8/15		9/13		8/13	
	Etilismo	0	12/17	0,038*	8/11	0,734	9/13	0,174	11/13	0,054	9/13	0,533
		1	5/17		3/11		4/13		2/13		4/13	
	Doenças associadas	A	3/14	0,256	4/12	0,063	1/9	0,036*	4/11	0,090	4/11	0,829
		B	4/14		4/12		4/9		3/11		2/11	
		C	0/14		0/12		0/9		0/11		0/11	
		D	6/14		4/12		4/9		4/11		4/11	
		E	1/14		0/12		0/9		0/11		1/11	

Legendas: **NIV BG:** Neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau; **NIV AG:** Neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau. Tabagismo: **0** = Não; **1** = Sim. Etilismo: **0** = Não; **1** = Sim. Doenças associadas: **A**= DSI (doenças do sistema imune); **B**= NIC (neoplasia intraepitelial cervical); **C**= NIVA (neoplasia intraepitelial vaginal); **D**= Outras doenças/mais de uma doença; **E**= Sem doenças associadas. N total: 21 casos de NIV BG e 45 NIV AG. * Estatisticamente significativo, p <0,05.

A diminuição de expressão de CD8 foi observada em casos de CAI P com invasão da derme profunda e subcutânea ($p=0,037$). De modo adicional, identificamos uma diminuição significativa de FOXP3 nos casos de CAI P com ausência de invasão vascular ($p=0,016$). Já, nos casos de CAI I, foi observada uma diminuição de expressão de CD3 e presença de invasão de derme profunda e subcutânea. Além disso, também mostramos que a diminuição de CD8 e FOXP3 estava associada significativamente com a ausência de hábitos tabagistas, invasão de derme profunda e subcutânea, e também, invasão vascular e perineural (**Tabela 10**). As demais características clinico-patológicas não demonstraram associação com a expressão dos outros marcadores analisados.

Tabela 10 - Expressão forte/moderada de CD3, CD4, CD8, CD20 e FOXP3 versus dados clinico-patológicos em carcinoma invasivo

	Variáveis	Categoria	CD3 N/total	p	CD4 N/total	p	CD8 N/total	p	CD20 N/total	p	FOXP3 N/total	p
CAI P	Tabagismo	0	16/20	0,749	15/19	0,510	14/18	0,925	16/18	0,221	15/17	0,638
		1	4/20		4/19		4/18		2/18		2/17	
	Etilismo	0	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
		1	0/0		0/0		0/0		0/0		0/0	
	Profundidade de invasão	0	12/21	0,208	14/21	0,087	13/20	0,037*	11/20	0,326	11/20	0,513
		1	9/21		7/21		7/20		9/10		9/20	
	Invasão Vascular	0	18/21	0,176	18/21	0,398	19/20	0,091	18/20	0,397	19/19	0,016*
		1	3/21		3/21		1/20		2/20		0/19	
	Invasão Perineural	0	17/20	0,364	18/21	0,262	19/20	0,078	18/21	0,581	18/20	0,346
		1	3/20		3/21		1/20		3/21		2/20	
	Metástase Linfonodal	0	8/14	0,598	9/14	0,447	7/10	1,000	7/12	0,815	10/14	0,349
		1	6/14		5/14		3/10		5/12		4/14	
	Estadiamento FIGO	0	13/21	0,564	13/21	0,481	14/20	0,617	14/21	0,377	15/21	0,148
		1	8/21		8/21		6/20		7/21		6/21	
	Doenças associadas	A	13/21	0,926	13/21	0,229	14/20	0,782	14/21	0,782	15/21	0,116
		B	8/21		8/21		6/20		7/21		6/21	
CAI I	Tabagismo	0	15/19	0,665	15/20	0,585	13/19	0,039*	16/19	0,118	15/19	0,985
		1	4/19		5/20		3/19		3/19		4/19	
	Etilismo	0	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-	0/0	-
		1	0/0		0/0		0/0		0/0		0/0	
	Profundidade de invasão	0	16/21	0,004*	12/21	0,070	11/21	0,542	11/21	0,113	14/21	0,011*
		1	5/21		9/21		10/21		9/11		7/21	
	Invasão Vascular	0	19/21	0,098	17/21	0,589	15/20	0,435	17/20	0,199	18/20	0,030*
		1	2/21		4/21		5/20		3/20		2/10	
	Invasão Perineural	0	19/21	0,098	16/20	0,845	16/21	0,276	16/19	0,364	19/21	0,026*
		1	2/21		4/20		5/21		3/19		2/21	
	Metástase Linfonodal	0	8/13	1,000	8/14	0,841	7/14	0,437	8/14	0,841	6/12	0,977
		1	5/13		6/14		7/14		6/14		6/12	
	Estadiamento FIGO	0	13/20	0,848	11/21	0,513	9/20	0,071	15/21	0,285	10/20	0,908
		1	7/20		10/21		11/20		6/21		10/20	
	Doenças associadas	A	13/20	0,405	11/21	0,229	9/20	0,332	15/21	0,459	10/20	0,518
		B	7/20		10/21		11/20		6/21		10/20	

Legendas: CAI P: carcinoma invasivo peritumoral; CAI I: carcinoma invasivo intratumoral. Tabagismo: **0** = Não; **1** = Sim; Etilismo: **0** = Não; **1** = Sim; Profundidade de invasão: **0** = Derme superficial e média; **1**= Derme profunda e subcutânea. Invasão Vascular: **0** = Ausente; **1** = Presente. Invasão Perineural: **0** = Ausente; **1** = Presente. Metástase Linfonodal: **0** = Ausente; **1** = Presente. Doenças associadas: **0** = NIV BG, NIV AG, NIV clássico ou apenas uma doença; **1** = CA in situ, acantose, líquen escleroso e atrófico ou mais de uma doença; Estadiamento FIGO: **0** = I e II; **1** = III e IV. N total de 44 casos em carcinoma invasivo. * Estatisticamente significativo, p <0,05.

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES LINFÓIDES (CD3, CD4, CD8, CD20 E FOXP3) NO CARCINOMA INVASOR DA VULVA E SUA RELAÇÃO COM O STATUS MOLECULAR DO HPV

A **Tabela 11** apresenta os níveis de expressão dos marcadores linfoides e sua relação com o *status* do HPV nos casos de carcinoma invasor da vulva. Foi observado uma diminuição de expressão de CD4 em casos com CAI P ($p=0,007$) e CAI I ($p=0,048$) positivos para HPV. O aumento na expressão de CD8 esteve significativamente associado com casos HPV positivos em CAI I ($p=0,035$). No entanto, não observamos associação estatisticamente significativa entre os outros marcadores e a presença do HPV.

Tabela 11 - Status do HPV e a expressão moderada/forte dos marcadores em carcinoma vulvar invasivo

		CD3	p	CD4	p	CD8	p	CD20	p	FOXP3	p
CAI P	HPV -	15/22	0,414	17/22	0,007 *	12/22	0,764	13/22	0,764	15/22	0,132
	HPV +	7/22		5/22		10/22		9/22		7/22	
CAI I	HPV -	13/22	0,530	15/22	0,048 *	9/22	0,035 *	12/22	0,785	11/22	0,374
	HPV +	9/22		7/22		13/22		10/22		11/22	

Legendas: CAI P: carcinoma invasivo peritumoral; CAI I: carcinoma invasivo intratumoral. N total de 44 casos em carcinoma invasivo. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

5.6 ANÁLISE DAS SOBREVIDAS GLOBAL, CÂNCER ESPECÍFICA E LIVRE DE DOENÇA, SEGUNDO A EXPRESSÃO DE MARCADORES LINFÓIDES (CD3, CD4, CD8, CD20 E FOXP3) NO CARCINOMA INVASOR DA VULVA

Na **Tabela 12** estão representadas as expressões dos marcadores e sua relação na sobrevida global, câncer-específica e livre de doença das pacientes com carcinomas invasivos vulvares. A diminuição de expressão de CD4 foi associada significativamente com o maior tempo de sobrevida global dos casos com CAI I ($p=0,019$) (**Figura 5A**). Já, o aumento de expressão de CD3 e FOXP3 foi observado em casos com CAI P que apresentavam maior tempo de sobrevida câncer específica ($p=0,042$ e $p=0,036$, respectivamente) (**Figura 6A e 6B**). Além disto, foi demonstrado que o aumento de expressão de FOXP3 estava presente em casos de CAI P com maior tempo livre de doença ($p=0,029$). Da mesma maneira, o aumento de CD3 esteve associado com os casos de CAI I que apresentavam maior tempo livre de doença ($p=0,039$) (**Figura 7A e 7B**). A mediana do tempo de seguimento das pacientes foi de 49,7, com valor máximo de 301,4 e mínimo de 1,8 meses de seguimento. Após o seguimento, 52,2% das pacientes do estudo estavam vivas, sendo que 73% destas apresentaram recidiva.

Tabela 12 - Sobrevidas global, câncer específica e livre de doença e sua relação com a expressão moderada/forte dos marcadores linfóides no carcinoma invasivo nas regiões peri- e intratumoral.

	Marcadores	Sobrevida Global	Sobrevida Câncer Específica	Sobrevida Livre de doença
		p	p	p
CAI P	CD3	0,219	0,042*	0,064
	CD4	0,306	0,557	0,199
	CD8	0,230	0,206	0,073
	CD20	0,443	0,819	0,919
	FOXP3	0,131	0,036*	0,029*
CAI I	CD3	0,935	0,664	0,037*
	CD4	0,019*	0,051	0,524
	CD8	0,083	0,193	0,644
	CD20	0,144	0,347	0,644
	FOXP3	0,191	0,179	0,059

Legenda: CAI P = Carcinoma invasivo peritumoral; CAI I = carcinoma invasivo intratumoral. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

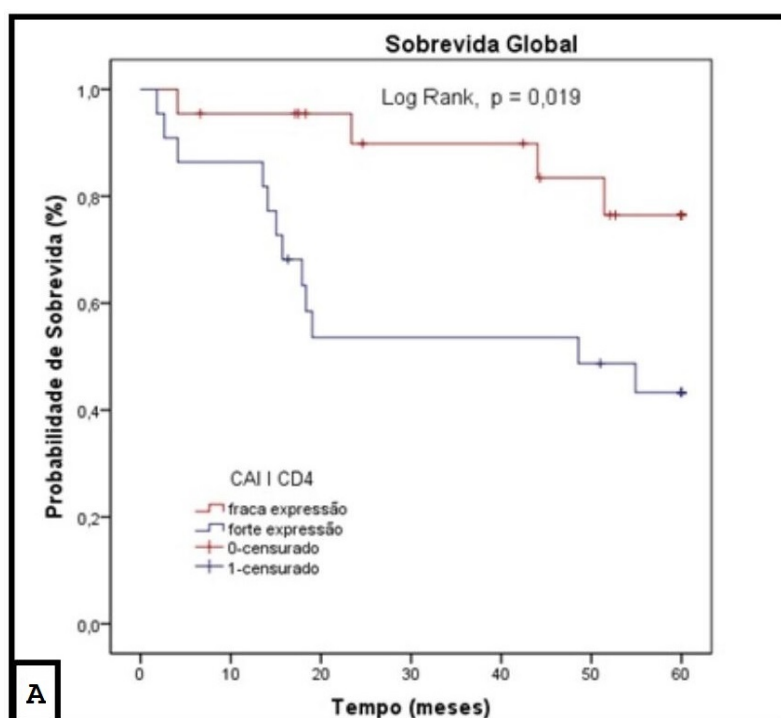


Figura 5 - Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador. Apresentam maior probabilidade de sobrevida as pacientes de CAI I que apresentam expressão fraca de CD4 ($p=0,019$) (**A**). Método de Kaplan-Meier, teste de Log-Rank.

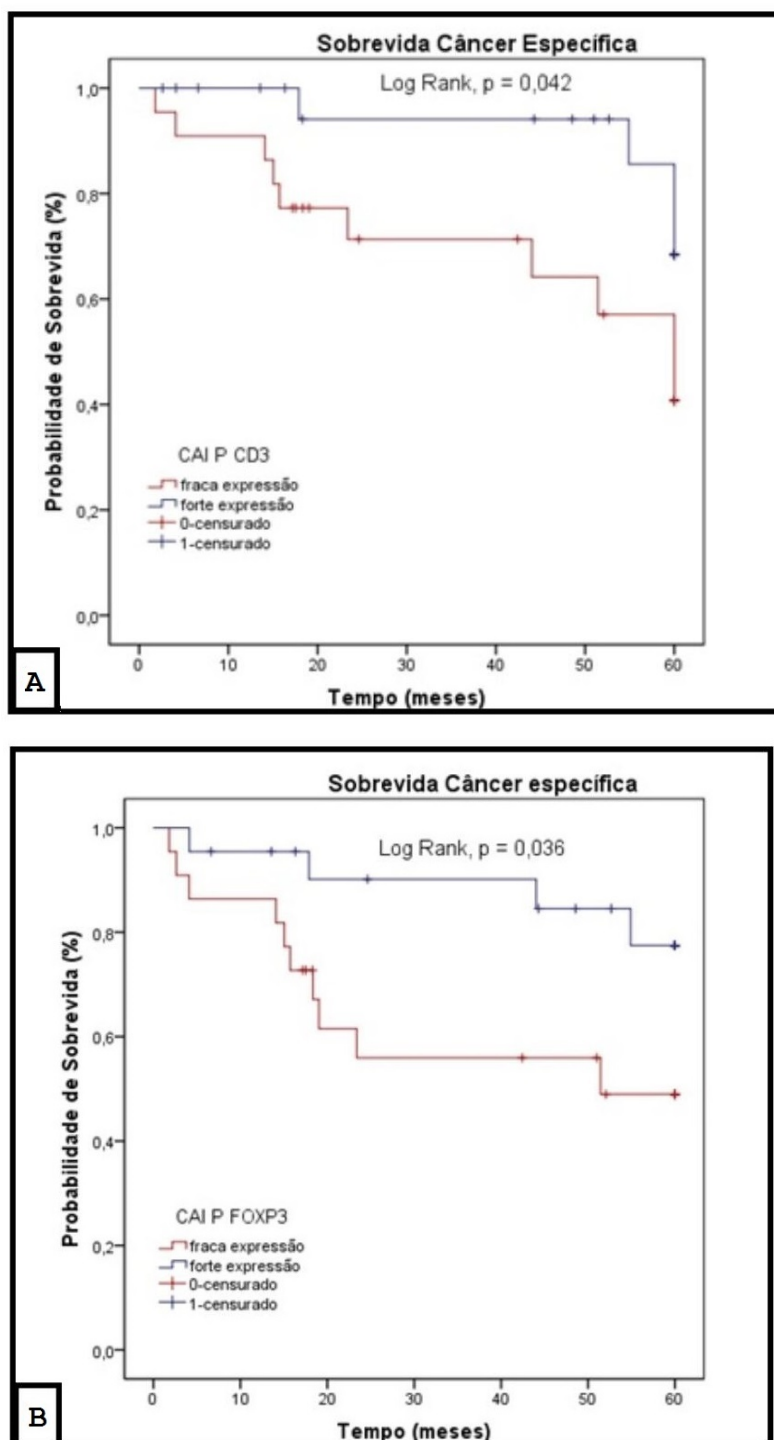


Figura 6 - Sobrevida câncer específica relacionada à expressão dos marcadores. A maior probabilidade de sobrevida está associada a forte expressão de **(A)** CD3 em CAI P ($p=0,042$) e **(B)** a forte expressão de FOXP3 em CAI P ($p=0,036$). Método de Kaplan-Meier, teste de Log-Rank.

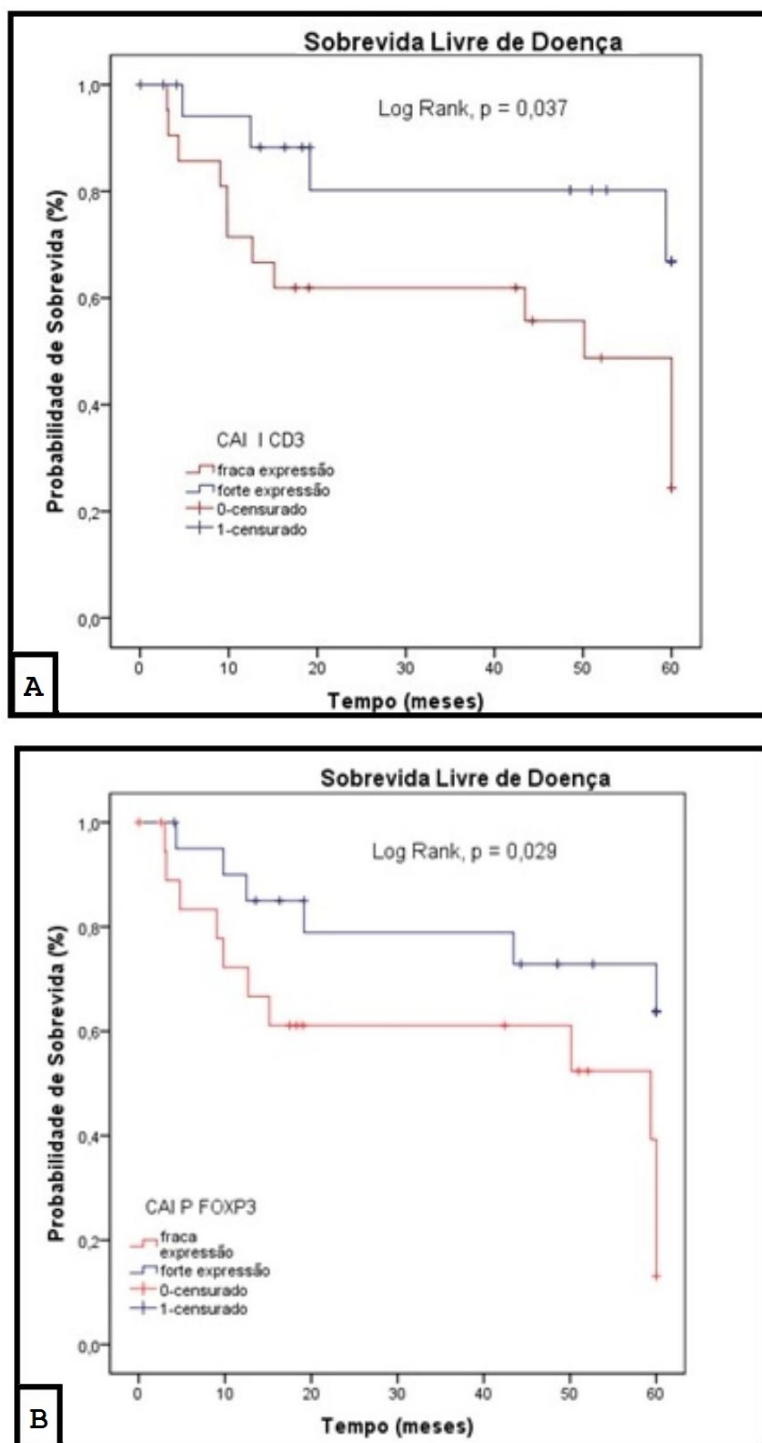


Figura 7 - Sobrevida livre de doença associada à expressão dos marcadores inflamatórios. A maior probabilidade de sobrevida está associada a forte expressão de **(A)** CD3 em CAI I ($p=0,037$) e **(B)** a forte expressão de FOXP3 em CAI P ($p=0,029$). Método de Kaplan-Meier, teste de Log-Rank.

Os parâmetros clínico-patológicos do carcinoma vulvar invasivo também foram avaliados e tiveram suas características associadas com as sobrevidas globais, câncer-específicas e livre de doença. Entretanto, não houve associação significativa em nenhum caso (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Sobrevida global, câncer específica e livre de doença e sua relação com as características clínico-patológicas no carcinoma invasivo da vulva.

			Sobrevida Global	Sobrevida Câncer Específica	Sobrevida Livre de doença
	Categoria	N/ N total (%)	p	p	p
Tabagismo	0	31/38 (81,6)	0,559	0,712	0,738
	1	7/38 (18,4)			
Etilismo	0	0/0 (0)	-	-	-
	1	0/0 (0)			
Status HPV	0	25/44 (56,8)	0,164	0,292	0,433
	1	19/44 (43,2)			
Profundidade de invasão	0	20/42 (47,6)	0,106	0,250	0,482
	1	22/42 (52,4)			
Invasão vascular	0	32/40 (80)	0,654	0,461	0,148
	1	8/40 (20)			
Invasão perineural	0	33/40 (82,5)	0,261	0,147	0,068
	1	7/40 (17,5)			
Metástase linfonodal	0	14/24 (58,4)	0,268	0,157	0,791
	1	10/24 (41,6)			
Estadiamento FIGO	0	25/42 (59,5)	0,187	0,066	0,452
	1	17/42 (40,5)			
Doenças associadas	0	3/12 (25)	0,362	0,362	0,257
	1	9/12 (75)			

Legenda: Tabagismo: **0** = Não; **1** = Sim; Etilismo: **0** = Não; **1** = Sim; Profundidade de invasão: **0** = Derme superficial e média; **1** = Derme profunda e subcutânea. Invasão Vascular: **0** = Ausente; **1** = Presente. Invasão Perineural: **0** = Ausente; **1** = Presente. Metástase Linfonodal: **0** = Ausente; **1** = Presente. Estadiamento FIGO: **0** = I e II; **1** = III e IV. Doenças associadas: **0** = NIV BG, NIV AG, NIV clássico ou apenas uma doença; **1** = CA in situ, acantose, líquen escleroso e atrófico ou mais de uma doença. N total de 44 casos em carcinoma invasivo. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram caracterizadas as diferentes células inflamatórias ao longo da progressão do carcinoma vulvar. Nossos dados mostraram que há um aumento considerável de células inflamatórias à medida que ocorre a transformação maligna, uma vez que a presença de células imunitárias esteve mais evidente no carcinoma invasivo do que em neoplasias intraepiteliais, sugerindo uma resposta progressivamente mais importante do sistema imune contra as células transformadas. Além disso, notamos que a intensidade do infiltrado inflamatório influenciou significativamente o tempo de sobrevida da paciente. Nestes aspectos, trata-se de um estudo com contribuição original, pois, embora em muitos outros tipos de neoplasia haja estudos da relevância clínica da inflamação peritumoral, estes inexistiam no carcinoma vulvar, com a abrangência aqui avaliada.

De acordo com CENDEJAS et al. (2015), o diagnóstico habitual de uma amostra de biópsia vulvar é realizado através da avaliação histológica e posterior classificação em lesões de baixo e alto grau. Dentre essas duas categorias, são encontradas dois tipos de lesão que diferem em morfologia, biologia e características clínicas (SIDERI et al. 2005). Entretanto, como o objetivo deste trabalho foi classificar os tipos de infiltrado inflamatório presente à medida que ocorre o avanço da doença, adotamos em nossas

análises a divisão categorizada das lesões em NIV BG, NIV AG e CAI e não de acordo com suas vias patogênicas.

Os dados obtidos através da análise da morfologia do infiltrado inflamatório evidenciaram o aumento de infiltrado composto por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, com predomínio de células linfoplasmocitárias em todas as fases do espectro de neoplasia intraepitelial até invasora (**Tabela 5**), sugerindo que a imunovigilância adaptativa esteja atuando na para impedir o avanço da doença. De acordo com PAGÈS et al. (2010), as células tumorais podem interagir com seu microambiente e sofrer influência por sinais do estroma, do endotélio e do sistema imune. Os tumores são muitas vezes infiltrados por linfócitos e acredita-se que esses componentes possam controlar o avanço da neoplasia. A infiltração de células imunitárias, em especial, células T é um importante fator prognóstico em diversas fases da doença, inclusive no tumor primário (PAGÈS et al. 2010), entretanto, outros autores mostram que essas células podem aparecer em maior número nas neoplasias avançadas ou mais agressivas (SIMONSON e ALLISON 2011).

A presença de infiltrado imune peritumoral nos primeiros estágios da neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) foi observado por VAN DE NIEUWENHOF et al. (2008), que descreveu a presença de um infiltrado crônico, constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Nossos resultados também evidenciaram a presença dessas células em NIV, mais especificamente de linfócitos e plasmócitos, porém, estas células não apresentaram relação com os dados demográficos

inseridos no estudo (etilismo, tabagismo e doenças associadas) (**Tabelas 5 e 6**).

O papel do sistema imune ainda é controverso em diversas neoplasias. A inflamação crônica pode ser um fator determinante para o curso do crescimento tumoral ou pode agir controlando a tumorigênese e eliminando células neoplásicas. Desta forma, a inflamação pode ter relevância prognóstica e preditiva em diversas neoplasias (SIMONSON e ALLISON 2011). Em nosso estudo, os resultados evidenciaram que a maior intensidade do infiltrado inflamatório estava associada com prognóstico favorável no carcinoma invasivo. Nos casos de CAI I que apresentavam baixa expressão ou ausência de infiltrado inflamatório, especialmente células linfocitárias, foi observada maior profundidade de invasão da derme profunda e subcutânea e invasão vascular. Por outro lado, casos com presença de metástase linfonodal e outras doenças estiveram associados com baixa densidade de plasmócitos (**Tabela 7**). Os fatores envolvidos com o menor infiltrado imune podem implicar no curso desfavorável da doença e ressaltam a importância dessas células na tentativa de controle e eliminação neoplásica do carcinoma vulvar. O infiltrado de células T demonstrou inibir o crescimento tumoral em diversos tipos de tumores sólidos, como carcinoma de cólon (BRAHA et al. 2015), cabeça e pescoço (BALERMPAS et al. 2014), ovário (ZHANG et al. 2003), mama (KIM et al. 2013), colorretal (NOSHO et al. 2010), pulmão (KAWAI et al. 2008) e melanoma (CLEMENTE et al. 1996), e foi associado com o melhor prognóstico nestes tumores. No entanto, em câncer de próstata, foi relatado que as altas densidades de

células linfoides estão correlacionadas com metástase e menor sobrevida livre da doença, implicando em um prognóstico desfavorável (NESS et al. 2014).

Dados sobre a presença de infiltração de plasmócitos em resposta à tumores ainda é escassa, apesar de serem frequentemente observados em processos inflamatórios decorrentes de tumores. Em carcinoma peniano, a presença de plasmócitos sugere uma associação com imunidade anti-tumoral (VASSALLO et al. 2015). Assim, nossos achados parecem demonstrar a mesma relação em neoplasias vulvares devido à alta densidade destas células em regiões peri e intratumorais e a associação benéficas com as características clínicas das pacientes. Nossos resultados mostraram que a presença de infiltrado inflamatório de plasmócitos não demonstrou exercer influência no tempo de sobrevida das pacientes.

Na análise dos marcadores imunoistoquímicos para cada tipo de célula linfóide, os resultados obtidos mostraram aumento significativo de CD3, CD8 e FOXP3 em NIV BG, NIV AG, CAI P e CAI I. Com exceção do CD4, que teve intensidade reduzida na progressão de lesão precursora a carcinoma invasivo, os demais marcadores aumentavam em intensidade à medida que a doença progredia (**Figura 2, Tabela 8**). Esse aumento parece exercer um papel antineoplásico, já que nas análises de sobrevida para CD3 e FOXP3, o seu aumento de intensidade esteve relacionado a sobrevida mais favorável. O oposto ocorreu com CD4.

A relação com o local de infiltração linfóide (peri e intratumoral) em câncer é um fator muito importante e pode determinar o curso da doença.

Existem grandes diferenças entre os linfócitos que estão localizados dentro do tumor (intratumorais) e aqueles que estão dispostos ao longo das margens da lesão ou do tumor invasivo (peritumorais) (SORBYE et al. 2012). Os microambientes tumorais, em diferentes regiões, podem influenciar o sistema imune a promover uma resposta anti-tumoral ou na progressão da doença, determinando o melhor ou o pior prognóstico e sobrevida. Em tumores sólidos, a localização tumoral e o prognóstico da doença variam em cada tipo de câncer, remetendo à importância na investigação das regiões em que o infiltrado está presente (JOCHEMS e SCHLOM et al. 2011). Em carcinoma de ovário, por exemplo, os níveis de infiltrado de células T presentes na região intratumoral determinam o melhor prognóstico em estádios avançados (ZHANG et al. 2003), ao passo que altas densidades de células T regulatórias na região intratumoral estão relacionadas com o pior prognóstico em câncer gástrico (SHEN et al. 2010; LIU et al. 2015) e hepatocelular (HUANG et al. 2012). Neste contexto, no presente trabalho, observamos um infiltrado inflamatório mais denso nas regiões peritumorais, favorecendo a hipótese de que essa região apresenta maior imunovigilância de células inflamatórias do que regiões intratumorais, todavia, não houve diferenças prognósticas relacionadas à localização do infiltrado. O infiltrado inflamatório de células T em regiões peri- e intratumorais apresentaram características favoráveis em relação aos dados demográficos e clínico-patológicos, além de melhor sobrevida das pacientes com a doença invasiva.

Em neoplasias vulvares de baixo grau, os marcadores inflamatórios presentes nas regiões adjacentes às lesões não demonstraram associação com os dados demográficos e comportamentais nas pacientes (**Tabela 9**). Já em NIV AG, a expressão de CD8 peritumoral aumenta quando ocorre associação com outras doenças, como as do sistema imune, neoplasia intraepitelial cervical ou nos casos em que há e mais de um tipo de doença (**Tabela 9**). Não há relatos que descrevam o aumento da expressão de CD8 relacionado com a presença de doenças associadas, porém, uma vez que o CD8 atua como principal célula efetora antitumoral (WARD et al. 2014), sua forte expressão parece agir como uma tentativa de controlar o avanço da neoplasia vulvar. Curiosamente, o hábito etilista esteve associado com a diminuição de infiltração de linfócitos T CD3 e células B CD20 (**Tabela 9**). De modo geral, não há relatos dos efeitos do etilismo especificamente sobre as células CD3 e CD20, entretanto, dados existentes indicam que os efeitos do consumo crônico de álcool sobre o sistema imunológico aceleram a deterioração das células inflamatórias, o que reflete, dentre outros fatores, ao comprometimento de células T e B na circulação. Os efeitos dinâmicos na imunidade antitumoral ocasionados pela ingestão de bebidas alcoólicas apresentam duas fases opostas: a primeira reflete na estimulação imune e inibição do tumor, por outro lado, a segunda e mais importante resulta na interação entre os efeitos do álcool e o tumor, que permite a progressão tumoral através da inibição imunitária (ZHANG et al. 2015).

No carcinoma invasivo, o infiltrado imune apresentou significativo impacto em relação às características clínico-patológicas das pacientes. A

intensa marcação de CD3 localizado na região intratumoral se apresentou fortemente associada com a menor profundidade de invasão (derme superficial e média) (**Tabela 10**). A importância de CD3 em neoplasias é amplamente relatada na literatura. Este antígeno é um complexo de proteínas que compreende o receptor de células T, ou seja, as células que expressam este marcador constituem uma mistura de células T, incluindo as auxiliares, regulatórias e citotóxicas, fundamentais na resposta anti-tumoral (NEDERGAARD et al. 2007). A presença de CD3 é descrita como indicador de melhor prognóstico e sobrevida em câncer cervical (NEDERGAARD et al. 2007), cólon (SINICROPE et al. 2009) e pulmão (JOHNSON et al. 2000). Nossos resultados também evidenciaram impacto na sobrevida das pacientes: em CAI I, a forte expressão de CD3 remeteu a uma maior probabilidade de sobrevida livre da doença (**Figura 7A**) e em CAI P, apesar de não ter havido associação com os dados clínico-patológicos, a marcação intensa apresentou aumento no tempo de sobrevida câncer específica ($p=0,042$, **Figura 6A**).

A infiltração de subpopulações de CD8 em tumores tem sido associada com resultados favoráveis (GENTLES et al. 2015). Estas células são consideradas as principais efetoras antitumorais e sua abundância tem se mostrado um importante preditor de bom prognóstico em diversos tumores como o de cabeça e pescoço (WARD et al. 2014) e colorretal (GALON et al. 2006). No presente estudo, o marcador CD8, localizado na região peritumoral do carcinoma invasivo, apresentou associação significativa com a profundidade de invasão (**Tabela 10**). Os casos que

tiveram marcação intensa apresentaram invasão limitada apenas à derme superficial e média, o que sugere que a presença de CD8 parece estar atuando na tentativa de impedir o avanço da doença e favorecendo o melhor prognóstico em carcinoma de vulva. WARD et al. (2014) demonstraram que CD8 parece desempenhar um papel ativo no reconhecimento tumoral. Em modelos experimentais utilizando animais geneticamente modificados para a deficiência em células imunes, foi demonstrado que a ausência de CD8 e CD4 promoveu um crescimento tumoral maior e mais rápido (HANAHAH e WEINBERG 2011).

Interessantemente, nossos resultados mostraram que a baixa expressão de CD8 em CAI I apresentou relação com hábitos tabagistas (**Tabela 10**). Um estudo realizado por ANDREOLI et al. (2015) em indivíduos gêmeos, saudáveis, sem doenças detectáveis, mas discordantes para o tabagismo investigou alterações em marcadores imunológicos associados a esse hábito. Os resultados mostraram que o número de células T CD8 foi estatisticamente inferior em indivíduos fumantes, sugerindo que o tabagismo apresenta associação com alterações imunes. Estudos realizados em pacientes com câncer de pulmão mostraram redução das defesas do hospedeiro e imunossupressão relacionados ao tabagismo. A nicotina e o consumo de cigarro apresentam propriedades imunossupressoras em humanos, animais e em modelos *in vitro*, uma característica que pode contribuir para o aumento na incidência de câncer entre os indivíduos fumantes. É bem estabelecido na literatura o papel do tabagismo como um importante fator de risco na carcinogênese de várias neoplasias, como o

carcinoma de vulva (HILL-DANIEL e ROETT 2015), cervical (IARC 2004; MUÑOZ et al. 2006) e cabeça e pescoço (UPPALURI et al. 2008).

Outro fator de risco relevante para a progressão e estabelecimento de tumores é a presença de infecção pelo HPV. Nossos dados evidenciaram uma intensa expressão de CD8 preferencialmente em casos de CAI I positivos para infecção pelo HPV (**Tabela 11**). Em um estudo realizado em câncer de tonsila, os autores observaram a mesma correlação, mostrando que os casos HPV positivos apresentaram maior quantidade de infiltrado CD8 comparados com os aqueles que eram HPV negativos (NÄSMAN et al. 2012). Esta característica é amplamente relatada em diversos outros tipos de tumores, como o colorretal (GALON et al. 2006), cabeça e pescoço (BALERMPAS et al. 2016) e o cervical (NEDERGAARD et al. 2007; PIERSMA et al. 2007). O aumento de células CD8 e CD4 foi relatado na literatura como característica de infecção viral por HPV. Isto ocorre devido à ativação sistêmica da imunidade adaptativa mediada pela presença do vírus (VAN SETERS et al. 2008).

SANTEGOETS et al. (2008) e VAN SETERS et al. (2008) haviam relatado o aumento de CD8 em neoplasia intraepitelial vulvar relacionada ao HPV, em relação com os casos sem o vírus. Como a tipagem do HPV em nossos casos de NIV não foi possível, temos apenas o dado de CAI, que mostrou, igualmente, aumento na intensidade de CD8 nos casos HPV+. Em estudos anteriores, foi relatado que a positividade para o HPV se associaria positivamente com a sobrevida das pacientes, o que foi devido à maior intensidade de infiltração por linfócitos CD8+ (TODD et al. 2004; OGINO et

al. 2006), e com a melhor evolução clínica da doença (NÄSMAN et al. 2012). Embora não tenhamos demonstrado influência do status do HPV no prognóstico de nossas pacientes com CAI, a maior densidade de linfócitos CD8+ foi relacionada a sobrevida mais favorável. Este dado é apoiado por estudos com outros tipos de câncer. A infiltração mais pronunciada de CD8 pode influenciar positivamente o prognóstico de alguns tipos de neoplasias e esta pode ser a principal razão pela qual, nestes grupos, indivíduos HPV positivos apresentam melhores resultados frente aos HPV negativos. Todas as evidências e a forte correlação positiva entre a presença de CD8 e a boa evolução clínica indicam que este marcador parece ser promissor como biomarcador de prognóstico em carcinomas relacionados com o HPV, como é o caso do carcinoma de vulva.

A defesa do hospedeiro contra a infecção por HPV conta também com a célula inflamatória CD4, de fundamental importância e observada em diversos tumores que apresentam a carcinogênese relacionada à presença viral. Nossos resultados mostraram que a diminuição na densidade de CD4 estava presente em casos de CAI P (**Tabela 11**) e em CAI I (**Tabela 11**), em pacientes positivos para o HPV. As células CD4 têm um papel fundamental na iniciação e manutenção de respostas imunes antitumorais, uma vez que secretam várias citocinas que coordenam a resposta imune inata (SIMONSON e ALLISON 2011). Entretanto, estas células apresentam um papel controverso na progressão tumoral, uma vez que subconjuntos de linfócitos T reguladores (T_{reg}) ocorrem naturalmente a partir da diferenciação de CD4 e aparecem associados com o mau prognóstico em alguns tipos de

câncer. Isto ocorre porque células T_{reg} são capazes de suprimir a proliferação da resposta imune específica ao tumor que, por sua vez, permite o crescimento tumoral. De modo contrário, o CD4 também está associado a bom prognóstico em doenças malignas como o linfoma folicular e carcinoma de células escamosas (SHAH et al. 2011). O papel das células T_{reg} difere entre a etiologia e o tipo de neoplasia. Geralmente as células T_{reg} são importantes por atuarem como principais mediadores da supressão imune ao tumor, entretanto, um elevado número dessas células infiltrantes pode acarretar resultados desfavoráveis. Apesar disto, há relatos de que as células T_{reg} apresentam um fator prognóstico favorável em câncer colorretal (PARTLOVÁ et al. 2015).

Nossos resultados demonstraram que houve uma redução no número de infiltrado de células T CD4 com o avanço da doença. Esta característica foi observada também por VAN ESCH et al. (2015b) em NIV relacionada ao HPV. Os mesmos autores relataram em outro artigo que a regressão espontânea do HPV está associada com a resposta imune específica de CD4 e CD8 a partir da presença viral sistêmica, porém, a maioria das pacientes com NIV apresentam uma resposta de linfócitos T fraca ou ausente (VAN ESCH et al. 2015a). Um estudo recente também observou o decréscimo de CD4 em carcinoma de cavidade oral e sugeriu que a redução das células pode estar relacionada com a ingestão de bebidas alcoólicas. A razão disto pode advir dos supostos efeitos imunossupressores do consumo crônico de álcool, mas outra hipótese indica que a pequena quantidade de

infiltrado é encontrada em neoplasias pouco diferenciadas, que tendem a ser menos imunogênicas (WOLF et al. 2014).

Geralmente a alta infiltração de CD4 está associada com melhor evolução clínica como, por exemplo, em câncer de ovário avançado (ZHANG et al. 2003; BADOUAL et al. 2006). Contraditoriamente, alguns estudos sugerem que o aumento de infiltrado de CD4 está associado com o mau prognóstico em carcinoma de células renais. Alguns estudos explicam que essa discrepância parece ser devida à heterogeneidade no fenótipo de células T CD4 (BROMWICH et al. 2003; BADOUAL et al. 2006).

Nossos resultados evidenciaram uma diminuição na expressão de CD4 em CAI I em casos que apresentaram maior tempo de sobrevida global e câncer específica (**Figura 5A e 6B**). Esta associação provavelmente está relacionada à positividade do HPV. WARD et al. (2014) sugeriram que uma explicação plausível para a diferença na sobrevida entre pacientes HPV positivos e negativos ocorre devido ao fato de que tumores ocasionados por vírus podem provocar uma resposta imune adaptativa dirigida contra os antígenos virais expressos no tumor. Desta forma, a resposta imune que age contra o antígeno viral exógeno seria menos propensa a ser suprimida. Não haveria tolerância imunológica central para confundir as tentativas do sistema imunológico para controlar o desenvolvimento de células neoplásicas.

De acordo com os dados controversos relatados acerca das células T_{reg}, investigamos em nosso estudo o papel de FOXP3, uma classe de células T_{reg} mais relevantes. Estes linfócitos são designados a exercerem

atividade imunossupressora, induzindo a tolerância ao crescimento neoplásico (SIMONSON e ALLISON 2011). Desta forma, em diversos tipos tumorais o aumento de células T_{reg} FOXP3 está relacionado com o mau curso da doença e piores sobrevidas (WOLF et al. 2005; DE JONG et al. 2012), como em câncer de colo uterino (ZENG et al. 2013; LUO et al. 2015), hepático (HUANG et al. 2012), tireóide (CUNHA et al. 2012) e melanoma (KNOL et al. 2011).

Porém, esta relação de FOXP3 com pior prognóstico não ocorre em todos os tipos de neoplasias. Nossos resultados mostraram que a infiltração crescente de FOXP3 ao longo da progressão da doença esteve associada a melhor prognóstico e melhor tempo de sobrevida das pacientes com neoplasias vulvares. A expressão de FOXP3 não apresentou qualquer relação com os dados demográficos e comportamentais de NIV BG e AG. Entretanto, no carcinoma invasivo, a expressão intensa de FOXP3 esteve positivamente associada com os dados clinico-patológicos das pacientes, como: à ausência de invasão vascular em CAI P; em CAI I, à menor profundidade de infiltração, ausência de invasão vascular e perineural (**Tabela 10**). Ambas as regiões apresentaram importância prognóstica no carcinoma invasivo de vulva, sugerindo que a forte presença de FOXP3 esteja contribuindo no controle da invasão, independentemente da localização das células T_{reg}. Adicionalmente, observamos que as pacientes com expressão intensa de FOXP3 nas regiões peritumorais apresentaram maior tempo de sobrevida câncer específica (**Figura 6 B**) e livre de doença (**Figura 7 B**) e a região intratumoral apresentou maior sobrevida livre de

doença (**Figura 7 C**), fortalecendo as evidências de que FOXP3 atua como fator antitumoral em neoplasias vulvares. O aumento de FOXP3 relacionado a um prognóstico favorável foi observado também nos carcinomas de cabeça e pescoço (RUSSELL et al. 2014), tonsila (PARK et al. 2013), colorretal (SALAMA et al. 2009; LADOIRE et al. 2011). Alguns estudos têm sugerido que FOXP3 apresenta associação favorável em casos com positividade para o HPV. VAN ESCH et al. (2015a) relataram recentemente que casos com NIV induzida pelo HPV apresentou elevados níveis de infiltração estromal quando comparados com o tecido normal (80 vs. 20%). Eles concluíram que as lesões ocasionadas pela infecção por HPV exibem um infiltrado mais intenso de células T_{reg} FOXP3. De modo semelhante, LOHNEIS et al. (2015) observaram as diferenças no infiltrado que acompanhavam as lesões com positividade e negatividade para o HPV no carcinoma peniano, com maior número de células FOXP3 positivas nos casos positivos para o HPV. Os autores também sugerem que o número de células citotóxicas e reguladoras, juntamente com outros fatores, podem ser os responsáveis pelo aumento na sobrevida de pacientes com infecção por HPV (LOHNEIS et al. 2015).

O HPV parece ser um fator importante para o desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias, que se não tratadas podem progredir para o câncer. Estudos apontam que as neoplasias vulvares que acometem uma faixa etária mais baixa, além de terem relação com a infecção por HPV, apresentam como cofatores, a displasia vulvar e o fumo (HØRDING et al. 1994; LANNEAU et al. 2009).

CHEN et al. (2014) relataram ser bem estabelecido que fatores ligados ao estilo de vida, tabagismo e também o etilismo, podem promover a tumorigênese induzida pelo vírus. O etilismo pode atuar como cofator, uma vez que a ingestão de uma dada quantidade de álcool a um período de tempo prolongado induz o stress oxidativo nas células infectadas. No câncer de orofaringe, um subtipo de neoplasia de cabeça e pescoço, a associação entre o HPV e o consumo de bebidas alcóolicas representa um importante fator de risco para o desenvolvimento neoplásico e essa relação pode ter relevância na neoplasia vulvar (GAO e SMITH 2015). Nós verificamos em nossos resultados que o etilismo pode estar envolvido no desenvolvimento de NIV AG e contribuir para o carcinoma invasivo (**Tabela 3**).

Geralmente o HPV é eliminado naturalmente pelo sistema imune do hospedeiro, mas muitas vezes o vírus evade a essa resposta e persistência viral poderá ocasionar o desenvolvimento do carcinoma. Ainda que a incidência de lesões neoplásicas parecesse estar crescendo na população jovem, o carcinoma invasivo ainda é um evento extremamente raro (BRĂTILĂ et al. 2015). Os dados demográficos e comportamentais das pacientes do nosso estudo sugerem que o aumento de lesões neoplásicas não implica diretamente no aumento da incidência de carcinoma invasivo em uma faixa etária mais baixa, corroborando com os achados de VAN DE NIEUWENHOF et al. (2009) (**Tabela 3 e 4**). Além disso, o carcinoma vulvar apresenta um crescimento lento e tende a permanecer localizado por um vasto período de tempo (MAGGINO et al. 2000; SCHEISTRØEN et al. 2002). Segundo SILVA et al. (2004), apenas 2% das lesões causadas pelo

HPV evoluem para o carcinoma invasivo, o qual sugere a existência de diferentes eventos moleculares para o surgimento do fenótipo invasivo.

Apesar de haver relatos na literatura sobre o atual aumento na incidência de mulheres jovens com neoplasia vulvar decorrentes de infecção por HPV, nossos dados mostram o predomínio de mulheres com idade mais avançada em carcinoma invasivo (**Tabela 4**). Apesar de não ser um evento comum em mulheres mais velhas com carcinoma invasivo, algumas pacientes do nosso estudo apresentaram infecção por HPV (**Tabela 4**). Nestes casos, observamos que a associação com o HPV remeteu a menores índices de invasão vascular, perineural e metástase linfonodal e a invasão apenas nas regiões da derme superficial e média. KUMAR et al. (2009) relataram que tumores associados ao HPV parecem ter um melhor prognóstico em comparação àquelas pacientes com mutação em *TP53*, visto que o papilomavírus é considerado um preditor independente de melhor sobrevida. De modo semelhante, em câncer de cabeça e pescoço é bem estabelecida a associação do HPV com o melhor prognóstico (ANDERSEN et al. 2014).

O líquen escleroso constitui o principal fator de risco para o processo neoplásico em mulheres idosas, uma vez que provoca prurido intenso e acarreta uma hiperplasia, levando a progressão da atipia para NIV, carcinoma in situ e eventual invasão. A doença invasiva, por ser estar associada a mulheres idosas, é menos comum a presença de infecção por HPV, o que pode ocorrer em uma pequena parcela de mulheres. Dessa forma, as atipias celulares da idade são as responsáveis por conduzirem ao

processo cancerígeno (DEPPE et al. 2014; ALKATOUT et al. 2015). Além disto, é bem estabelecido que mulheres com NIV pós-menopausa apresentem maior risco de a doença progredir para a invasiva. Portanto, nesses casos é de fundamental importância a adoção de terapias excisionais para identificar a presença de lesões ocultas em mulheres pós-menopausa (NUGENT et al. 2011).

Parâmetros como o tamanho do tumor, profundidade de invasão, grau histológico e invasão do espaço vascular estão estritamente relacionados com o status linfonodal, que representa o fator prognóstico mais importante em neoplasias vulvares (DE JONG et al. 2012; PANICI et al. 2015). Além disto, NICOLETTO et al. (2010) descreveram que os tumores que apresentam grau histológico I e II são preditos de melhor sobrevida livre de doença. No presente estudo, a maioria das pacientes apresentavam tumores em estádios I e II da doença, com ausência de invasão vascular ou perineural e metástase linfonodal (**Tabela 4**).

Apesar das limitações inerentes a um estudo retrospectivo, com número de casos relativamente pequeno e ausência de tipagem molecular do HPV no grupo das pacientes com NIV, o presente trabalho traz contribuições para o estudo da relação entre progressão das neoplasias vulvares com o vírus e o papel do infiltrado inflamatório relacionado à neoplasia. Além disto, a análise dos preparados imunoistoquímicos foi feita de forma automatizada, para homogeneizar e padronizar os resultados. Mesmo assim, é desejável que estudos com grupos independentes de pacientes validem os resultados aqui apresentados com a finalidade de

poder tornar estas avaliações parte da avaliação prognóstica das pacientes com CAI vulvar. Estes resultados podem compor o quadro ainda incipiente do microambiente tumoral, que apenas começa a mostrar o potencial que apresenta na compreensão da oncogênese e nas alternativas terapêuticas.

Em suma, nossos principais achados foram:

- O infiltrado inflamatório foi composto por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, com predominância de linfócitos e plasmócitos em todos os grupos;
- A intensidade dos infiltrados linfóide e plasmocitário aumentou de forma gradativa ao longo da progressão da doença (de NIV BG até CAI);
- A expressão de CD3, CD8 e FOXP3 tendeu a crescer na progressão da doença de NIV BG até CIV; a expressão de CD4 teve comportamento inverso; a expressão de CD20 foi variável nos grupos estudados.
- Nos casos de CAI, o predomínio de casos de infecção por HPV foi no grupo de pacientes mais velhas; estes achados não tiveram significância estatística;
- Pacientes com CAI relacionado ao HPV tiveram associação com parâmetros patológicos mais favoráveis, como por exemplo, menor profundidade de invasão, ausência de invasão vascular, perineural, de metástase linfonodal e estádios mais precoces segundo as categorias FIGO;
- Em casos de CAI positivos para HPV, houve associação com a redução de CD4 intra e peritumoral e aumento de CD8 intratumoral; embora o status do HPV não tenha tido impacto prognóstico em nosso grupo de

pacientes, este achado se coaduna com o prognóstico favorável de casos com baixa expressão de CD4.

- A maior intensidade de infiltração de linfócitos e plasmócitos nos CAI esteve associada com características patológicas de melhor prognóstico, como: menor profundidade de invasão, ausência de invasão vascular e de metástase linfonodal; entretanto, esses parâmetros visuais não forneceram impacto significativo nas sobrevidas;
- A expressão aumentada de CD8 e FOXP3 na região peritumoral mostrou-se relacionada a parâmetros patológicos de melhor prognóstico (menor profundidade de invasão da pele e ausência de invasão vascular); na região intratumoral, a expressão aumentada de CD3 e FOXP3 esteve relacionada a parâmetros patológicos de melhor prognóstico (menor profundidade de invasão da pele e ausência de invasão vascular ou neural);
- O etilismo esteve associado com a baixa expressão de CD3 e CD20; apesar de valores baixos de CD3 se associarem com pior sobrevida câncer específica e livre de doença, não houve impacto do etilismo nas sobrevidas;
- Apenas a expressão aumentada de CD4 intratumoral apresentou impacto desfavorável na sobrevida global;
- A expressão aumentada de CD3 e FOXP3 na região peritumoral associou-se a sobrevida câncer específica favorável;
- A expressão aumentada de CD3 na região intratumoral e de FOXP3 na região peritumoral associou-se a melhor sobrevida livre de doença.

7 CONCLUSÕES

- 1 O presente estudo permitiu caracterizar o infiltrado inflamatório e demonstrar que existem diferenças significativas durante a progressão das lesões precursoras até carcinoma, influenciável pela infecção do HPV. Além disso, alguns dos marcadores analisados estiveram relacionados a parâmetros clinicopatológicos, com valor prognóstico.
- 2 O infiltrado inflamatório associado às lesões epiteliais vulvares é predominantemente do tipo linfóide T e plasmocitário; esses componentes têm a tendência a aumentar de intensidade na progressão da lesão de baixo grau até carcinoma.
- 3 Observamos algumas diferenças clínicas e poucas diferenças na constituição celular quanto ao status do HPV:
- 4 As diferentes populações de células inflamatórias estiveram relacionadas aos parâmetros clinicopatológicos de agressividade tumoral, bem como podem representar marcadores de prognóstico:

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkatout I, Schubert M, Garbrecht N, et al. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. **Int J Womens Health** 2015; 7:305-13.

Allen CT, Judd NP, Bui JD, Uppaluri R. The clinical implications of antitumor immunity in head and neck cancer. **Laryngoscope** 2012; 122:144-57.

Alonso I, Fusté V, del Pino M, et al. Does human papillomavirus infection imply a different prognosis in vulvar squamous cell carcinoma? **Gynecol Oncol** 2011; 122:509-14.

Alvarenga AW, Coutinho-Camillo CM, Rodrigues BR, et al. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. **J Histochem Cytochem** 2013; 61:272-82.

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

Andersen AS, Koldjaer Sølling AS, Ovesen T, Rusan M. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2014; 134:2755-63.

Andreoli C, Bassi A, Gregg EO, Nunziata A, Puntoni R, Corsini E. Effects of cigarette smoking on circulating leukocytes and plasma cytokines in monozygotic twins. **Clin Chem Lab Med** 2015; 53:57-64.

Aragona AM, Cuneo NA, Soderini AH, Alcoba EB. An analysis of reported independent prognostic factors for survival in squamous cell carcinoma of the vulva: is tumor size significance being underrated? **Gynecol Oncol** 2014; 132:643-8.

Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-2007 - a Nationwide population-based study. **Gynecol Oncol** 2011; 122:45-49.

Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4 + T-cell subpopulations in head and neck cancers. **Clin Cancer Res** 2006; 12:465-72.

Baiocchi G. **Manual de condutas em ginecologia oncológica**. 2010. Disponível em <URL:<http://www.accamargo.org.br/files/pdf/manual-de-condutas-ginecologia/manual-conduta-palm.pdf>> [2015 mar 12].

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

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

Balermipas P, Rödel F, Weiss C, Rödel C, Fokas E. Tumor-infiltrating lymphocytes favor the response to chemoradiotherapy of head and neck cancer. **Oncoimmunology** 2014; 3:e27403.

Balermipas P, Rödel F, Rödel C, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: a multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). **Int J Cancer Int J Cancer** 2016; 138:171-81.

Barbuto JAM. Imunoterapias e vacinas. In: Ferreira CG; Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.427-33.

Bellati F, Napoletano C, Gasparri ML, et al. Monoclonal antibodies in gynecological cancer: a critical point of view. **Clin Dev Immunol** 2011; 2011:890758.

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.

Boccardo E, Lepique AP, Villa, LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2010; 31:1905-12.

Braha M, Chikman B, Habler L, et al. Lymphocytic infiltration as a prognostic factor in patients with colon cancer. **Int J Surg Pathol** 2015 Jul 27. [Epub ahead of print]

Brătilă E, Brătilă CP, Comandasu DE, et al. Perineal reconstruction with biologic graft vulvoplasty for verrucous carcinoma treated by repeated vulvar excisions : a case report. **Rom J Morphol Embryol** 2015; 56:537-43.

Bromwich EJ, McArdle PA, Canna K, et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. **Br J Cancer** 2003; 89:1906-8.

Buonomo T, Carraresi L, Rossini M, Martinelli R. Involvement of aryl hydrocarbon receptor signaling in the development of small cell lung cancer induced by HPV E6/E7 oncoproteins. **J Transl Med** 2011; 9:2.

[CCS] Canadian Cancer Society. **Anatomy and physiology of the vulva.** Available from: <URL:<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/vulvar/anatomy-and-physiology/?region=on>> [2015 set 29].

Campion MJ. Preinvasive disease. In: Berek JS, Hacker, NF, editors. **Gynecologic oncology.** 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p.318-28.

Canavan TP, Cohen D. Vulvar cancer. **Am Fam Physician** 2002; 66:1269-74.

Cartwright-Alcares F, O'Sullivan J. Anatomy, physiology, and pathophysiology. In: Almadrones-Cassidy L, editor. **Site-specific cancer series: gynecologic cancers.** Pittsburgh: Oncology Cancer Society; 2010. p.9-10.

Cendejas BR, Smith-McCune KK, Khan MJ. Does treatment for cervical and vulvar dysplasia impact women's sexual health? **Am J Obstet Gynecol** 2015; 212:291-7.

Chen B, Liu L, Xu H, Yang Y, Zhang L, Zhang F. Effectiveness of immune therapy combined with chemotherapy on the immune function and recurrence rate of cervical cancer. **Exp Ther Med** 2015; 9:1063-7.

Chen Y, Williams V, Filippova M, Filippov V, Duerksen-Hughes P. Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration. **Cancers (Basel)** 2014; 6:2155-86.

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

Chow LT. Model systems to study the life cycle of human papillomaviruses and HPV-associated cancers. **Virol Sin** 2015; 30:92-100.

Clemente CG, Mihm MC, Jr, Bufalino R, et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer** 1996; 77:1303-10.

Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. **Clinics (Sao Paulo)** 2012; 67:483-8.

de Gregorio N, Ebner F, Schwentner L, et al. The role of preoperative ultrasound evaluation of inguinal lymph nodes in patients with vulvar malignancy. **Gynecol Oncol** 2013; 131:113-7.

de Jong RA, Toppen NL, Ten Hoor KA, et al. Status of cellular immunity lacks prognostic significance in vulvar squamous carcinoma. **Gynecol Oncol** 2012; 125:186-93.

de Melo Ferreira AP, de Figueiredo EM, Lima RA, et al. Quality of life in woman with vulvar cancer submitted to surgical treatment: a comparative study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2012; 165:91-5.

de Melo Maia B, Lavorato-Rocha A, Rodrigues IS, et al. microRNA portraits in human vulvar carcinoma. **Cancer Prev Res (Phila)** 2013a; 6:1231-41.

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

del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Histopathology** 2013; 62:161-75.

Deppe G, Mert I, Winer IS. Management of squamous cell vulvar cancer: a review. **J Obstet Gynaecol Res** 2014; 40:1217-25.

Dong F, Kojiro S, Borger DR, Growdon WB, Oliva E. Squamous cell Carcinoma of the vulva: a subclassification of 97 cases by clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features (p16, p53, and EGFR). **Am J Surg Pathol** 2015; 39:1045-53.

Duarte-Franco E, Franco EL. Other gynecologic cancers: endometrial, ovarian, vulvar and vaginal cancers. **BMC Women's Health** 2004; 4(suppl I):S14.

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

Fernandes JV, Cobucci RNO, Jatobá CAN, et al. The role of the mediators of inflammation in cancer development. **Pathol Oncol Res** 2015b; 21:527-34.

Feng Y, Martin P. Imaging innate immune responses at tumour initiation: new insights from fish and flies. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:556-62.

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

Fusco E. Preinvasive disease of the cervix, vulva, and vagina. In: Almadrones-Cassidy L, editor. **Site-specific cancer series: gynecologic cancers**. Pittsburgh: Oncology Cancer Society; 2010. p.37-43.

Gao G, Smith DI. Mate-pair sequencing as a powerful clinical tool for the characterization of cancers with a DNA viral etiology. **Viruses** 2015; 7:4507-28.

Gadducci A, Tana R, Barsotti C, Guerrieri ME, Genazzani AR. Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva. **Crit Rev Oncol/Hematol** 2012; 83:71-83.

Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro J-M, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. **Oncotarget** 2014; 5:12472-508.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science** 2006; 313:1960-4.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. **J Pathol** 2014; 232:199-209.

Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. **Nat Med** 2015; 21:938-45.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2011; 140:883-99.

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

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

Hacker NF, Barlow EL. Staging for vulvar cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2015; 29:802-11.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hill-Daniel J, Roett MA. Genital cancers in woman: vulvar cancer. **FP Essent** 2015; 438:31-43.

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

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.

Holthoff ER, Jeffus SK, Gehlot A, et al. Perineural invasion is an independent pathologic indicator of recurrence in vulvar squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2015; 39:1070-4.

Hoevenaars BM et al. A panel of p16, MIB1 and p53 proteins can distinguish between the two pathways leading to vulvar squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 123:2767-73

Horn LC et al. HPV-assozierte Veränderungen an Vulva und Vagina. Morphologie und Molekularpathologie. **Pathologe** 2011; 32:467-75.

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

Huang Y, Wang F, Wang T, et al. Tumor-infiltrating FoxP3+ tregs and CD8+ T cells affect the prognosis of hepatocellular carcinoma patients. **Digestion** 2012; 86:329-337.

Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentia. **Int J Cancer** 2007; 121:2373-80.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **Cancer Incidence in five continents, vol. VI**. Lyon: IARC; 1992.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **Tobacco smoke and involuntary smoking**. Lyon: IARC; 2004. (Technical reports nº 3.)

Insinga R, Liaw K, Johnson L, 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.

Jochems C, Schlom J. Between conventional cancer therapy and immunity. **Exp Biol Med** 2012; 236:567-79.

Jones RW, Rowan D, Stewart A. Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. **Obstetr Gynecol** 2005; 106:1319-26.

Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, et al. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. **Lung Cancer** 2000; 27:27-35.

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

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Genitalia externa; p.448.

Karlitepe A, Ozalp O, Avci CB. New approaches for cancer immunotherapy. **Tumor Biol** 2015; 36:4075-8.

Kawai O, Ishii G, Kubota K, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(1) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. **Cancer** 2008; 113:1387-95.

Kerdiles Y, Stone E, Beisner D. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. **Immunity** 2010; 33:890-904.

Kim ST, Jeong H, Woo OH, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. **Am J Clin Oncol** 2013; 36:224-31.

Knol AC, Nguyen JM, Quéreux G, Brocard A, Khammari A, Dréno B. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. **Exp Dermatol** 2011; 20:430-4.

Knopp S, Tropè C, Nesland J, et al. A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. **J Clin Pathol** 2010; 62:212-218.

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.

Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. **WHO Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs**. 4^a ed., IARC, Lyon, 2014. Tumours of the vulva; p. 314-334.

Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer. **Cancer Immunol Immunother** 2011; 60:909-18.

Lança T, Silva-Santos B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and implications for cancer surveillance and immunotherapy. **Oncoimmunology** 2012; 1:717-25.

Lanneau GS, Argenta PA, Lanneau MS, et al. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. **Am J Obstetr Gynecol** 2009; 200: 645.e1-645.e5.

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

Lindell G, de Melo Maia B, Rodrigues IS, et al. Presence of human papillomavirus (HPV) in vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) and sentinel node, **Gynecol Oncol** 2010; 117:312-6.

Liu K, Yang K, Wu B, et al. Tumor-infiltrating immune cells are associated with prognosis of gastric cancer. **Medicine (Baltimore)** 2015; 94:e1631.

Lockhart J, Gray NM, Cruickshank ME. The development and evaluation of questionnaire to assess the impact of vulval intraepithelial neoplasia: a questionnaire study. **BJOG** 2013; 120:1133-42.

Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, et al. Regulatory (FOXP3⁺) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Cancer Sci** 2009; 100:1112-7.

Lohneis P, Boral S, Kaufmann AM, et al. Human papilloma virus status of penile squamous cell carcinoma is associated with differences in tumour-infiltrating T lymphocytes. **Virchows Arch** 2015; 466:323-31.

Luo Q, Zhang S, Wei H, Pang X, Zhang H. Roles of Foxp3 in the occurrence and development of cervical cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:8717-8730.

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]

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.

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

Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn L. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J Clin Virol** 2005, 32 Suppl 1:S43-51.

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.** 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.776-9.

Moore, DH, Koh W, McGuire WP, Wilkinson EJ. Vulva. In: Hoskins WJ, Peres CA, Young RC, Barakat RR, editors. **Principles and practice of gynecologic oncology.** 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.665-706.

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

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** 2006; 24 Suppl 3:S3/1-10.

Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, et al. Tumor infiltrating CD8 + and Foxp3 + Lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. **PLoS One** 2012; 7:1-8.

[NCI] National Cancer Institute. The Surveillance, Epidemiology, and End Results-SEER. **SEER stat fact sheets: vulvar cancer**. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html>> [2015a out 6].

[NCI] National Cancer Institute. **Vulvar cancer treatment, prognosis**. Available from: <URL:<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/vulvar/healthprofessional>> [2015b fev 5].

Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyengaard JR, Nielsen K. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. **Br J Cancer** 2007; 97:1135-8.

Nelson BH. CD20+ B Cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. **J Immunol** 2010; 185:4977-82.

Nelson EL, Bogliatto F. Vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and condylomata. **Clin Obstetr Gynecol** 2015; 58:512-25.

Ness N, Andersen S, Valkov A, et al. Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. **Prostate** 2014; 1461:1452-61.

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

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

Nosho K, Baba Y, Tanaka N, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. **J Pathol** 2010; 222:350-66.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity** 2014; 41:49-61.

Nugent EK, Brooks RA, Barr CD, et al. Clinical and pathologic features of vulvar intraepithelial neoplasia in premenopausal and postmenopausal women. **J Lower Genital Tract Dis** 2011; 15:15-9.

Ogino T, Shigyo H, Ishii H, et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. **Cancer Res** 2006; 66:9281-9.

Ouyang W, Beckett O, Ma Q et al. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells. **Nat Immunol** 2010; 11:618-27.

Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene** 2010; 29:1093-102.

Panici PB, Tomao F, Domenici L, et al. Prognostic role of inguinal lymphadenectomy in vulvar squamous carcinoma: younger and older patients should be equally treated. A prospective study and literature review. **Gynecol Oncol** 2015; 137:373-9.

Park K, Cho KJ, Lee M, et al. Importance of FOXP3 in prognosis and its relationship with p16 in tonsillar squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2013; 33:5667-73.

Partlová S, Bouček J, Kloudová K, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology** 2015; 4:e965570.

Picanço-Junior OM, Oliveira ALT, Freire LTM, Brito RB, Villa LL, Matos D. Association between human Papillomavirus and colorectal adenocarcinoma and its influence on tumor staging and degree of cell differentiation. **Arq Bras Cir Dig** 2014; 27:172-6.

Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Res** 2007; 67:354-61.

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

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

Preti M, Scurry J, Marchitelli CE, Micheletti L. Vulvar intraepithelial neoplasia. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2014; 28:1051-62.

Preti M. VIN usual type from the past to the future. **Ecancermedicalscience** 2015; 9:1-13.

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

Regauer S, Reich O. Etiology of vulvar cancer will impact on treatment options and therapy outcome: two major pathways of vulvar cancer. **Gynecol Oncol** 2013; 131:246-7.

Reyes MC, Cooper K. An update on vulvar intraepithelial neoplasia: terminology and a practical approach to diagnosis. **J Clin Pathol** 2014; 67:290-4.

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

Russell SM, Angell TE, Lechner MG, et al. Immune cell infiltration patterns and survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Oncol** 2014; 5:24.

Salama P, Phillips M, Grieu F, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:186-92.

Santegoets LA, et al. Reduced local immunity in HPV-related NIV: Expression of chemokines and involvement of immunocompetent cells. **Int J Cancer** 2008; 123:616-22.

Scheistrøen M, Nesland JM, Tropé C. Have patientes 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.

Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, et al. Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer Trial watch. **Oncoimmunology** 2012; 1:1323-43.

Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. **Cell Mol Immunol** 2011; 8:59-66.

Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor- infiltrating FoxP3 + regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep** 2015; 5:15179.

Shen Z, Zhou S, Wang Y, et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1585-95.

Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ, et al. Squamous vulvar intraepithelial lesions: 2004 modified terminology, ISSVD vulvar oncology subcommittee. **J Reprod Med** 2005; 50:807-10.

Silva IDCG, Otsuka AYILVA, Villanova FE, et al. Câncer ginecológico. In: **Oncologia molecular**. Ferreira CG, Rocha JC, editores. São Paulo: Atheneu; 2004. p.203-12.

Simonson WT, Allison KH. Tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: implications for the diagnostic pathologist. **Diagn Histopathol** 2011; 17:80-90.

Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. **Gastroenterology** 2009; 137:1270-9.

Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, et al. Prognostic impact of peritumoral lymphocyte infiltration in soft tissue sarcomas. **BMC Clin Pathol** 2012a; 12:5.

Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine** 2006; 24 Suppl 1:S16-22.

Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecol Oncol** 2008; 109(2 Suppl):S15-21.

Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol** 2010; 117(2 Suppl):S5-10.

Stern C, Kasnitz N, Kocijancic D, et al. Induction of CD4 + and CD8 + anti-tumor effector T cell responses by bacteria mediated tumor therapy. **Int J Cancer** 2015; 137:2019-28.

Stier E A., Sebring MC, Mendez AE, Ba FS, Trimble DD, Chiao EY. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related disorders in women: a systematic review. **Am J Obstet Gynecol** 2015; 213:278-309.

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.

Tabbaa ZM, Gonzalez J, Sznurkowski JJ, Weaver AL, Mariani A, Cliby WA. Impact of the new FIGO 2009 staging classification for vulvar cancer on prognosis and stage distribution. **Gynecol Oncol** 2012; 127:147-52.

Tili E, Michaille JJ, Croce CM. MicroRNA play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. **Immunol Rev** 2013; 253:167-84.

Todd RW, Steele JC, Etherington I, Luesley DM. Detection of CD8+ T cell responses to human papillomavirus type 16 antigens in women using imiquimod as a treatment for high-grade vulval intraepithelial neoplasia. **Gynecol Oncol** 2004; 92:167-74.

Trietsch MD, Nooij LS, Gaarenstroom KN, van Poelgeest MIE. Genetic and epigenetic changes in vulvar squamous cell carcinoma and its precursor lesions: a review of the current literature. **Gynecol Oncol** 2015; 136:143-57.

Tyring SK. Vulvar squamous cell carcinoma: Guidelines for early diagnosis and treatment. **Am J Obstetr Gynecol** 2003; 189(3 Suppl):S17-23.

Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. **J Skin Cancer** 2011; 2011:951250.

Uppaluri R, Dunn GP, Lewis Jr JS. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. **Cancer Immunity** 2008; 8:16.

van den Einden LC, Massuger LF, Jonkman JK, Bult P, de Hullu JA, Bulten J. An alternative way to measure the depth of invasion of vulvar squamous cell carcinoma in relation to prognosis. **Mod Pathol** 2015; 28:295-302.

van de Nieuwenhof HP, van der Avoort IAM, Hullu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 68:131-56.

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

van de Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. **Mod Pathol** 2011; 24:297-305.

van der Steen S, van de Nieuwenhof HP, Massuger L, Bulten J, de Hullu JA. New FIGO staging system of vulvar cancer indeed provides a better reflection of prognosis. **Gynecol Oncol** 2010; 119:520-5.

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

van Esch EMG, Van Poelgeest MIE, Kouwenber et al. Expression of coinhibitory receptors on T cells in the microenvironment of usual vulvar intraepithelial neoplasia is related to proinflammatory effector T cells and an increased recurrence-free survival. **Int J Cancer** 2015a; 136:E95-E106.

van Esch EMG, van Poelgeest MIE, Trimbos JBMZ, Fleuren GJ, Jordanova ES, Van der Burg SH. Intraepithelial macrophage infiltration is related to a high number of regulatory T cells and promotes a progressive course of HPV-induced vulvar neoplasia. **Int J Cancer** 2015b; 136:E85-E94.

van Seters M, van Beurden M, de Craen AJ. Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence? A systematic review of 3322 published patients. **Gynecol Oncol** 2005; 97:645-51.

van Seters M, Beckmann I, Heijmans-Antonissen C, et al. Disturbed patterns of immunocompetent cells in usual-type vulvar intraepithelial neoplasia. **Cancer Res** 2008; 68:6617-22.

Vassallo J, Rodrigues AFF, Campos AHJFM, et al. Pathologic and imunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence. **Tumor Biol** 2015; 2509-16.

Vasquez-Clarfield B, Duffy-Weiser. Vulvar and vaginal cancers. In: Almadrones-Cassidy L, editor. **Site-specific cancer series: gynecologic cancers**. Pittsburgh: Oncology Cancer Society; 2010. p.127-38.

Viola JPB, Teixeira LK, Werneck MBF. Imunologia tumoral. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.105-12.

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

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Wang Z, Tropè C, 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.

Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. **Br J Cancer** 2014; 110:489-500.

Woelber L, Trillsch F, Kock L, et al. Management of patients with vulvar cancer: a perspective review according to tumour stage. **Ther Adv Med Oncol** 2013; 5:183-92.

Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:8326-31

Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E, Nguyen A, Thomas D, McHugh J. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. **Oral Oncol** 2014; 51:1-6.

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:203-13.

Zhang H, Zhu Z, Zhang F, Meadows GG. Alcohol consumption and antitumor immunity: dynamic changes from activation to accelerated deterioration of the immune system. **Adv Exp Med Biol** 2015; 815:313-31.

Zhou G, Levitsky H. Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape. **Clin Dev Immunol** 2012; 2012:124187.

Zeng C, Yao Y, Jie W, et al. Up-regulation of Foxp3 participates in progression of cervical cancer. **Cancer Immunol Immunother** 2013; 62:481-7.

Zweizig S, Korets S, Cain JM. Key concepts in management of vulvar cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2014; 28:959-66.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 08 de setembro de 2015.

Ao

Dr. José Vassallo

Aluna: Flávia Lopes de Lima (Mestrado)

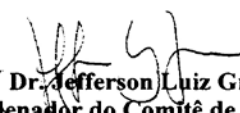
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1918/14

“Relação entre o status do HPV e reação inflamatória relacionada ao tumor no carcinoma da vulva e suas lesões precursoras”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 01/09/2015, tomaram conhecimento e aprovaram os seguintes documentos:

- Comunicação e justificativa de alteração de título do estudo acima mencionado, de “Relação entre perfil de expressão dos mi-RNAs, status do HPV e reação inflamatória relacionada ao tumor no carcinoma da vulva e suas lesões precursoras” para “Relação entre o status do HPV e reação inflamatória relacionada ao tumor no carcinoma da vulva e suas lesões precursoras”, em carta datada de 29 de julho de 2015;
- Nova Folha de Rosto gerada pela Plataforma Brasil, com a atualização do título do estudo no sistema, datada de 05 de agosto de 2015;
- Emenda ao protocolo em projeto datado de 08 de agosto de 2015.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Classificação morfológica das neoplasias vulvares segundo a Organização Mundial da Saúde

NEOPLASIAS EPITELIAIS
Carcinomas escamosos e lesões precursoras
<i>Carcinoma escamoso, sem outra especificação</i>
Queratinizante
Não-queratinizante
Basalóide
Condilomatoso (<i>warty</i>)
Verrucoso
Queratoacantoma-like
Variante com células gigantes
Outros
<i>Carcinoma basocelular</i>
<i>Neoplasia intraepitelial escamosa</i>
Neoplasia intraepitelial vulvar (NIV3)/carcinoma in situ
<i>Lesões epiteliais benignas</i>
<i>Neoplasias glandulares</i>
<i>Neoplasias de anexos cutâneos</i>
NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS
NEOPLASIAS DE TECIDOS MOLES
NEOPLASIAS HEMATOPOÉTICAS
MISCELÂNEA
NEOPLASIAS METASTÁTICAS

Fonte: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. Tumors of the Female Reproductive Organs. WHO Classification of Tumours, vol. 6 (Chapter 7, pp. 314-334). 4th Ed., IARC, Lyon, 2014.

Anexo 3 - Patogênese das lesões precursoras do carcinoma epidermóide da vulva, neoplasia intraepitelial cervical vulvar

	Neoplasia intraepitelial vulvar clássica/ usual	Neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada
Frequência ^a	90-98%	2-10%
Idade (anos) ^a	30-49	~ 65
Prognóstico ^a	Taxa de progressão: baixa; Tempo de progressão: longo	Taxa de progressão: alta; Tempo de progressão: curto
Risco de progressão ^a	Semelhante ao carcinoma de colo uterino	Desconhecido (precursor? Liquen escleroso e atrófico)
Morfologia ^a	Desarranjo arquitetural em toda espessura do epitélio; epitélio espessado de aspecto basalóide; distúrbio da queratinização; presença frequente de coilócitos e de disqueratose; inflamação subepitelial freqüente	Epitélio espessado de aspecto “espinhoso”; hiperqueratose freqüente; células basais e suprabasais atípicas; sem coilócitos; queratinócitos imaturos e pérolas córneas presentes; inflamação subepitelial variável
Vias patogénéticas	<i>Relacionada à infecção pelo HPV de alto risco</i>	<i>Relacionada a mutações do TP53</i>
Presença de HPV de alto risco ^b	HPV+ 38/45 (84.4%) HPV- 7/45 (15.6%)	HPV- 75/75 (100%) HPV+ 0/75
Imunoistoquímica para proteína P16+ ^b	38/38 (100%)	7/82 (8.5%)
Imunoistoquímica para proteína P53+ ^{bx}	2/38 (5.2%)	62/82 (75.6%)
Imunoistoquímica para MIB1 alto (Ki67) ^{bx}	38/38 (100%)	9/82 (10.9%)

Legendas: a: Horn LC et al. HPV-assozierte Veränderungen an Vulva und Vagina. Morphologie und Molekularpathologie. **Pathologe** 2011; 32: 467-75. / b: Hoevenaars BM et al. A panel of p16, MIB1 and p53 proteins can distinguish between the two pathways leading to vulvar squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 123: 2767-73. / x: presença de numerosas células positivas em posição suprabasal.

Anexo 4 - Estadiamento FIGO (2009) para o carcinoma de vulva

Estádio	Características clínicas
I	Tumor confinado à vulva e/ou períneo, linfonodos negativos: Ia: lesões com 2 cm ou menos confinados a vulva ou períneo com invasão de estroma de 1 mm ou menos. (Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo/microinvasivo); Ib: lesões maiores que 2 cm ou com invasão do estroma maior que 1 mm, confinadas à vulva ou ao períneo; linfonodos negativos
II	Tumor com extensão para estruturas perineais (1/3 inferior uretra, 1/3 inferior vagina, ânus) com qualquer tamanho e linfonodos negativos.
III	Tumor de qualquer tamanho com ou sem extensão para estruturas perineais (1/3 inferior uretra; 1/3 inferior vagina, ânus) e linfonodos inguino-femorais positivos: IIIa (i) 1 metástase linfonodal ($\geq 5\text{mm}$), ou (ii) 1-2 metástases linfonodais ($<5\text{mm}$); IIIb (i) 2 ou mais metástases linfonodais ($\geq 5\text{mm}$), ou (ii) 3 ou mais metástases linfonodais ($<5\text{mm}$) IIIc: Presença de extravasamento capsular.
IV	IVa: Tumor invadindo qualquer estrutura que se segue: (i) 2/3 superior de uretra 2/3 superior de vagina, mucosa vesical, mucosa retal, fixo ao osso pélvico. (ii) linfonodos inguino-femorais fixos ou ulcerados IVb: qualquer metástase à distância, incluindo linfonodos pélvicos

Fonte: Baiocchi G. Manual de Condutas em Ginecologia Oncológica. 2010. Disponível em <URL:<http://www.accamargo.org.br/files/pdf/manual-de-condutas-ginecologia/manual-conduta-palm.pdf>> [2015 mar 12].

Anexo 5 - Patogênese dos carcinomas da vulva

	Carcinoma vulvar tipo 1	Carcinoma vulvar tipo 2
Frequência	20-30%	70-80%
Idade (anos)	Mediana 55 (35-65)	Mediana 70 (55-85)
Prognóstico	Dependente do estágio	Dependente do estágio
Morfologia	Carcinoma espinocelular não queratinizante; padrão de infiltração predominante compressivo; desmoplasia variável	Carcinoma espinocelular queratinizante; padrão de infiltração predominante infiltrativo; frequente desmoplasia
Imunoistoquímica para proteína p16 e p14	Positiva	Negativa
Imunoistoquímica para MIB1 (Ki67)	Expressão alta	Expressão baixa
Vias patogénéticas	<i>Via do HPV</i>	<i>Via TP53</i>
Mecanismos patogénéticos	Infecção pelo HPV de alto risco; Inativação da p53 pela oncoproteína E6; Inativação da pRb pela oncoproteína E7; Ausência de mutação em p53; Ausência de instabilidade de microssatélites; Ausência de hipermetilação de MGMT e RASSF2A	Ausência de infecção pelo HPV de alto risco; Inativação da p53 por mutação ou mecanismos epigenéticos; Sem instabilidade de microssatélites; Hipermetilação de MGMT e RASSF2A

Fonte: Horn LC, et al. HPV-assozierte veränderungen an vulva und vagina. Morphologie und Molekularpathologie. **Pathologe** 2011; 32: 467-75.

Apêndice 1 - Reatividade e padrão de marcação dos anticorpos

Anticorpo	Reatividade	Padrão de marcação
CD20	Células linfóides B	Membrana
CD3	Células linfóides T	Membrana
CD4	Linfócitos T auxiliares, monócitos	Membrana
CD8	Linfócitos T citotóxicos	Membrana
FoxP3	Células T regulatórias	Núcleo