

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA PRIMÁRIA ASSOCIADA AO
TUMOR NO CARCINOMA INVASIVO DA VULVA E O
STATUS DO HPV**

FLÁVIA LOPES DE LIMA MILFONT

**Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente para a obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. José Vassallo

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

M644 Milfont, Flávia Lopes de Lima
Resposta inflamatória primária associada ao tumor no carcinoma invasivo da vulva. Flávia Lopes de Lima Milfont – São Paulo, 2020.
87p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. Neoplasias Vulvares/Vulvar Neoplasms. 2. Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica/Systemic Inflammatory Response Syndrome. 3. Biomarcadores/Biomarkers. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Papiloma vírus humano/Human Papillomaviridae

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às pessoas que sempre estiveram comigo em todos os momentos durante essa jornada, apoiando e incentivando que eu fosse atrás dos meus sonhos: meus pais, Zuleika e José Luiz. À minha avó Rosa, que se orgulha demasiadamente das minhas conquistas e mesmo distante fisicamente, sempre se faz presente. Agradeço por me ensinarem meus valores, educação e, acima de tudo, que conhecimento é algo que nunca nos será tirado. Eu cheguei onde hoje estou por tudo que eles me ensinaram a ser.

“The greatest thing is when you do put your heart and soul into something over an extended period of time, and it is worth it.”

“The only thing you have in your life is time. If you invest that time in yourself to have great experiences that are going to enrich you, then you can’t possibly lose.”

“We’re here to put a dent in the universe. Otherwise why else even be here?”

- Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, à Deus, que sempre prepara tem pra mim muito mais do que eu peço. Por acalmar meu coração nos momentos de aflição e por ser o motivo da minha fé.

Ao meu orientador, Dr. José Vassallo, que sempre foi como um anjo ao longo de toda a minha trajetória na pós graduação. Agradeço imensamente por ter finalizado essa missão ao meu lado e me ensinar muito além do que os temas desse trabalho, mas acima de tudo, me mostrado o que é ser um líder, que caminha e constrói junto. Obrigada pelas palavras sempre dóceis e pela forma de me fazer enxergar as adversidades como apenas mais um obstáculo.

A Dra. Louise de Brot, pelas análises minuciosas das lâminas e revisão dos casos ao longo desses anos, sempre com muita disposição em ajudar.

Ao Bernardo e Diego do CIPE, por me auxiliarem prontamente e com muita disposição na obtenção dos prontuários dos arquivos médicos. Não fosse a ajuda de vocês, não teríamos conseguido todos esses dados.

À estatística Bárbara Bettim, por sempre ter atendido rapidamente as minhas demandas e pelo excelente trabalho realizado.

À Dra. Marli Curcio, que mesmo sem me conhecer pessoalmente, aceitou participar do meu trabalho com maravilhosas sugestões e revisões.

Às minhas amigas e colegas de pós graduação Dra Beatriz Nunes, MSc. Isabella Ortiz e MSc. Isabella Tannus primeiramente pela amizade tão valiosa de cada uma; vocês foram presentes que ganhei nesses anos de pós graduação e principalmente pelo apoio, sugestões e por terem auxiliado nas correções pré defesa.

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

Ao Ivan, Severino e Carlinhos, que atenderem com prontidão e atenção no auxílio às técnicas de H&E e nos cortes de tecido, sempre que necessário.

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

À Kátia Klug, por ter me auxiliado diversas vezes em minhas dúvidas técnicas e nunca negar ajuda.

Ao Isaac Lima, do departamento de retrovirologia da UNIFESP, pelas aulas de estatística, pela paciência em me ouvir e me dar suporte sempre que precisei.

À minha família, minha base e essência; 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 em minhas decisões.

Ao marido e grande companheiro Fábio Milfont Lemos, que soube entender meus momentos de dedicação, sem nunca questionar; mas oferecendo ajuda nas madrugadas fora e oferecendo palavras de apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro (processo nº 2161/16) e à Fundação Antônio Prudente, por disponibilizar toda a infraestrutura para a realização deste trabalho.

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de auxílio à Pesquisa – Doutorado (nº 2161/16).

RESUMO

Milfont FLL. **Reação inflamatória primária associada ao tumor no carcinoma invasivo da vulva.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Resumo: O carcinoma escamoso de vulva (CEC) é uma neoplasia rara que corresponde a cerca de 3 a 5% dos tumores ginecológicos malignos. Seu surgimento é mais comum entre a sétima e oitava década de vida, entretando, nos últimos anos observou-se um aumento em sua incidência em mulheres jovens, possivelmente decorrente do crescimento do número de infecções por HPV. Duas vertentes dividem o carcinoma de vulva em vias distintas: uma relacionada à presença de infecção por HPV e a outra, associada a mutações no gene p53 e processos inflamatórios crônicos, sendo ambas precedidas por lesões precursoras (lesões intraepiteliais vulvares – VINs). O sistema imunológico atua com finalidade garantir a homeostase, entretanto, o contexto de inflamação e infecção costumam estar associadas ao desenvolvimento e progressão do câncer. A análise do microambiente imune do tumoral e seu impacto no resultado clínico podem prover informações preciosas para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos e evidenciar marcadores com valores preditivos de resposta terapêutica e/ou diagnóstica. **Objetivo:** Ampliar a caracterização dos componentes celulares do infiltrado inflamatório da primeira linha de defesa (imunidade inata) associados ao tumor em carcinoma vulvar, relacionar esses componentes ao status de infecção pelo HPV. **Métodos:** Quarenta e quatro amostras de tecido fixados em formalina e incluídas em parafina foram selecionadas de forma retrospectiva dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center no período de 1990 a 2015. Para a identificação dos marcadores imunológicos, foram realizados experimentos de imunohistoquímica e, posteriormente, esses marcadores foram quantificados através do programa APERIO®. **Resultados:** Com base nos padrões de infiltração de células imunológicas, a maior expressão ocorreu na região peritumoral nas duas vias de CEC vulvar (*HPV independente* e *HPV associado*) para os marcadores CD68, granzima B, perforina, S100, CD1a e PD-L1 ($p < 0,05$). A expressão de perforina foi maior em CEC HPV *independente* nas regiões peri- ($p = 0,004$) e intratumoral ($p = 0,021$). Em CEC HPV *independente*, a expressão intensa de S100 na região peritumoral foi associada a ausência de metástase linfonodal ($p = 0,008$); a expressão forte de S100 na região intratumoral foi associada a ausência de invasão vascular ($p = 0,007$) e ausência de metástase linfonodal ($p = 0,043$). Na via de CEC HPV *associado*, a expressão intensa de

perforina esteve relacionada a menor profundidade de invasão nas regiões peri- ($p=0,013$) e intratumoral ($p=0,022$). As expressões dos marcadores de células inflamatória apresentaram associação com sobrevida global e livre de doença para as vias do CEC de vulva. Em CEC HPV *independente*, a expressão intensa de CD1a na região intratumoral, correlacionou-se ao menor tempo de sobrevida livre de doença ($p=0,045$). Na via de CEC HPV *associado*, o aumento da expressão de CD56 foi associada ao menor tempo de sobrevida global ($p=0,043$); as expressões aumentadas de CD1a e PD-L1 na região peritumoral se correlacionaram a maior tempo de sobrevida livre de doença ($p=0,008$ e $p=0,021$, respectivamente). **Conclusão:** Esse é um estudo que caracteriza o infiltrado inflamatório tumoral correspondente a primeira linha de defesa (imunidade inata) do organismo nas duas vias do carcinoma escamoso de vulva. Nossos dados sugerem que o principal papel da imunidade inata em ambas as vias de CEC vulvar seja como mecanismo de defesa, na tentativa de impedir a progressão tumoral.

Descritores: Neoplasias Vulvares. Síndrome de Resposta Inflamatória Loco-regional. Biomarcadores. Imuno-Histoquímica. Papiloma vírus humano

ABSTRACT

Milfont FLL. [Primary inflammatory reaction associated with the tumor in invasive vulvar carcinoma]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

INTRODUCTION: Vulva squamous carcinoma (VSCC) is a rare neoplasm that corresponds around 3 to 5% of malignant gynecological tumors. Its incidence is more common between the seventh and eighth decade of life, however, recently it has increased in young women, possibly due to an increasing number of HPV infections. Two strands divide vulvar carcinoma into different way: one related to the presence of HPV infection and on the other hand, associated with mutations in p53 gene and chronic inflammatory processes, both of them are preceded by precursor lesions (vulvar intraepithelial lesions - VINs). The immune system acts to guarantee homeostasis, however, the context of inflammation and infection is usually associated with the development and progression of cancer. The analysis of the tumor microimmune environment and its impact on the clinical outcome can provide valuable information for a better understanding of the cellular mechanisms involved and evidence markers with predictive values of therapeutic and / or diagnostic response. **AIMS:** To expand the characterization of the cellular components of the inflammatory infiltrate of the first line of defense (innate immunity) associated with the tumor in vulvar carcinoma, relating these components to the status of HPV infection. **METHODS:** Forty-four tissue formalin fixed paraffin embedded samples were retrospectively selected from the archives of the Department of Anatomic Pathology of A.C.Camargo Cancer Center from 1990 to 2015. For the identification of immunological markers, experiments were carried out immunohistochemistry and, later, these markers were quantified using the APERIO® program. **RESULTS:** Based on the infiltration patterns of immune cells, the greatest expression occurred in the peritumoral region in both vulvar CPB pathways (independent HPV and dependent HPV) for the markers CD68, granzyme B, perforin, S100, CD1a and PD-L1 ($p < 0.05$). Perforin expression was higher in independent VSCC HPV in the peri- ($p = 0.004$) and intratumoral ($p = 0.021$) regions. In an independent VSCC HPV, the intense expression of S100 in the peritumoral region was associated with the absence of lymph node metastasis ($p = 0.008$); the strong expression of S100 in the intratumoral region was associated with the absence of vascular invasion ($p = 0.007$) and absence of lymph node metastasis ($p = 0.043$). In the VSCC HPV-dependent pathway, the intense expression of perforin was related to a lesser depth of invasion in the peri- ($p = 0.013$) and intratumoral ($p =$

0.022) regions. The expressions of the inflammatory cell markers were associated with global and disease-free survival for the VSCC pathways. In an independent VSCC HPV, the intense expression of CD1a in the intratumoral region, it was correlated with the shorter disease-free survival ($p = 0.045$). In the VSCC HPV-dependent pathway, increased CD56 expression was associated with shorter overall survival time ($p = 0.043$); the increased expressions of CD1a and PD-L1 in the peritumoral region correlated with longer disease-free survival ($p = 0.008$ and $p = 0.021$, respectively). **CONCLUSIONS:** Conclusion: This is a study that characterizes the inflammatory tumor infiltrate corresponding to the first line of defense (innate immunity) of the organism in the two pathways of squamous carcinoma of the vulva. Our data suggest that the main role of innate immunity in both pathways of VSCC is a mechanism defense, in an attempt to prevent tumor progression.

Keywords: Vulvar Neoplasms. Loco regional Inflammatory Response Syndrome. Biomarkers. Immunohistochemistry. Human Papillomavirus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da fisiopatologia das neoplasias intraepiteliais vulvares (VINs) dos tipos usual (uVIN) e diferenciada (dVIN) e sua progressão para carcinoma de células escamosas (CEC).....	4
Figura 2	Resumo esquemático contendo a literatura sobre o microambiente do carcinoma escamoso da vulva (CEC) e seus precursores.....	13
Figura 3	Comparação entre os CEC HPV independente e <i>HPV associado</i> com as expressões dos marcadores CD56 e CD68 das as regiões peri (CAI P) e intratumoral (CAI I)	26
Figura 4	Comparação entre os CEC HPV independente e <i>HPV associado</i> com as expressões dos marcadores Granzima B e Perforina das as regiões peri (CAI P) e intratumoral (CAI I).....	27
Figura 5	Comparação entre os CEC HPV independente e <i>HPV associado</i> com as expressões dos marcadores S100, CD1a e PD-L1 das as regiões peri (CAI P) e intratumoral (CAI I).....	28
Figura 6	Marcação imunohistoquímica de CD56, CD68, Granzima B e Perforina e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV negativos.....	30
Figura 7	Marcação imunohistoquímica S100, CD1a e PD-L1 e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV negativos.....	31
Figura 8	Marcação imunohistoquímica de CD56, CD68, Granzima B e Perforina e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV positivos	32
Figura 9	Marcação imunohistoquímica S100, CD1a e PD-L1 e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV positivos	33

Figura 10	Curva de sobrevida global associada à invasão vascular em CEC vulvar HPV independente.....	40
Figura 11	Curva de sobrevida livre de doença associada à invasão vascular + perineural em CEC vulvar HPV independente.....	40
Figura 12	Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador CD1a na região intratumoral (CAI I) em CEC vulvar HPV independente	42
Figura 13	Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador CD1a na região intratumoral (CAI I) em CEC vulvar <i>HPV associado</i> e curva de sobrevida global associada à expressão do marcador CD56 na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar <i>HPV associado</i>	43
Figura 14	Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador CD1a na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar HPV independente ...	44
Figura 15	Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador CD1a na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar HPV independente; Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador S100 na região intratumoral (CAI I) em CEC vulvar <i>HPV associado</i> ; Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador PD-L1 na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar <i>HPV associado</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros associados ao carcinoma de células escamosas dependente e independente da infecção por Papilomavírus Humano (HPV)	5
Tabela 2	Taxa de sobrevivência em 5 anos de acordo com o estágio do carcinoma de vulva.....	6
Tabela 3	Anticorpos primários, clones, fabricantes, diluições e padrões de marcação utilizados nas reações de imunohistoquímica (IHC).....	19
Tabela 4	Média, desvio padrão, mediana, máximo e mínimo das idades (em anos) de CEC de vulva de modo geral e dos grupos CEC HPV independente e dependente	22
Tabela 5	Subtipos virais identificados nas amostras de carcinoma de células escamosas (CEC) vulvar do tipo <i>HPV associado</i> , separando em alto e baixo risco oncogênico	23
Tabela 6	Caracterização demográfica e clínico-patológica de CEC de vulva dos tipos HPV <i>independente</i> e HPV <i>associado</i> utilizados nos experimentos de imunohistoquímica.....	24
Tabela 7	Valores medianos da expressão dos marcadores de células inflamatórias das regiões peri e intramural de CEC dos tipos HPV independente e <i>HPV associado</i>	25
Tabela 8	Associações entre as expressões moderada/forte dos marcadores CD56, CD68, Granzima B, Perforina, S100 e CD1a e os dados clínico-patológicos no carcinoma vulvar HPV independente (CEC HPV independente).....	35

Tabela 9	Associações entre as expressões moderada/forte dos marcadores CD56, CD68, Granzima B, Perforina, S100 e CD1a e os dados clínico-patológicos no carcinoma vulvar <i>HPV associado</i> (CEC <i>HPV associado</i>).....	37
Tabela 10	Sobrevida global e livre de doença relacionadas com as características clínico-patológicos de CEC HPV independente e <i>HPV associado</i>	39
Tabela 11	Associação entre as sobrevidas global e livre de doença (recidiva) e a expressão moderada/forte dos marcadores de células inflamatórias nas regiões peri e intratumoral no CEC de vulva HPV independente e <i>HPV associado</i>	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
bp	Pares de base
CAI I	Carcinoma invasivo intratumoral
CAI P	Carcinoma invasivo peritumoral
CAI	Carcinoma invasivo
CCND1	Gene responsável pela codificação da proteína <i>Cyclin</i>
CD	Linfócitos T; associado ao receptor de antígeno de células T
Fox-P3	<i>Forkhead box 3</i>
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CEC	Carcinoma celular de células escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
CTLA4	Antígeno-4 de linfócito T citotóxico
DAB	Diaminobenzidina
DM	Derme média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
DP	Derme profunda
DS	Derme superficial
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
Dsub	Derme subcutânea
dVIN	<i>differentiated vulvar intraepithelial neoplasia</i>
E2F	Gene de ativação de supressão tumoral

EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
H&E	Técnica de coloração hematoxilina-eosina
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IC	Intervalo de confiança
IHC	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
LA	<i>Linear Array</i>
M1	Pólo de macrófago relacionado a lipopolissacarídeos e interferon-gama
M2	Pólo de macrófago relacionado às interleucinas 4 e 13
MHC	Moléculas de histocompatibilidade
MHC-I	Moléculas de histocompatibilidade de classe I
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
Neg	Negativo
NF-kB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NIV BG	Neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau
NK	<i>Natural Killer</i>
NOTCH	Sinalização para supressão tumoral
PI3K-Akt	<i>Protein kinase B</i>

<i>p</i>	Nível de significância
p14ARF	Proteína supressora tumoral
p16	Proteína p16
p16INK4a	Proteína supressora tumoral
p53	Proteína p53
PBS	Tampão fosfato-salino
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PD-L2	<i>Programmed death ligand -2</i>
PNI	<i>Perineural invasion</i>
Pos	Positivo
pRB	Gene retinoblastoma
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RAG	Receptor de antígeno
RB	Retinoblastoma
ROR-gama-t	<i>Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand -1</i>
SAME	Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i>
T-bet	Células imunes específicas da família de transcriptases
TERTp	<i>Telomerase reverse transcriptase promoter</i>
Th	Células T helper
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral

TNM	Sistema de estadiamento internacional
TP53	Gene TP53
Treg	Células T reguladoras
uVIN	<i>usual vulvar intraepithelial neoplasia</i>
V+P	Vascular + perineural
vHSIL	<i>Vulvar high-grade squamous intraepithelial lesion</i>
VIN AG	Neoplasia intraepitelial vulvar de alto grau
VIN	Vulvar intraepithelial neoplasia
vs.	Versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	As neoplasias malignas da vulva	1
1.2	Carcinoma de células escamosas da vulva (CEC).....	2
1.2.1	Incidência.....	2
1.2.2	Etiologia e patogênese	3
1.2.3	Sinais, sintomas e tratamento	5
1.2.4	Fatores de prognóstico	6
1.2.5	Tratamento	7
1.3	Papel do papilomavírus humano no desenvolvimento tumoral.....	8
1.4	Sistema imune e a progressão tumoral	9
1.5	Lesão intraepitelial vulvar, carcinoma de vulva, HPV e imunidade local.....	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Casuística.....	17
3.2	Critérios de exclusão.....	17
3.3	Coleta de dados clínicos	17
3.4	Identificação e tipagem do HPV.....	18
3.5	Imunohistoquímica	18
3.6	Avaliação imunohistoquímica	19
3.7	Análise estatística da imunohistoquímica.....	20
3.8	Aspectos éticos	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Dados demográficos e clínico-patológico.....	22
4.2	Caracterização da expressão dos marcadores imunológicos CD56, CD68, granzima B, perforina, S100, CD1a e PD-L1 no CEC HPV <i>independente</i> e HPV <i>dependente</i> da vulva	25
5	DISCUSSÃO	46

6	CONCLUSÕES.....	64
7	REFERÊNCIAS.....	65

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP do A.C.Camargo Cancer Center - Fundação Antônio Prudente

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

Anexo 3 Estadiamento International Federation of Gynecology and Obstetrics-FIGO (2009) para o carcinoma de vulva

Anexo 4 Patogênese dos carcinomas da vulva

APÊNDICE

Apêndice 1 Reatividade e padrão de marcação dos anticorpos utilizados no estudo

1 INTRODUÇÃO

As queixas urogenitais estão entre os dez principais problemas relatados pelos ginecologistas em geral. Dentre estas queixas, especial atenção deste especialista se volta às doenças vulvovaginais, devido às suas apresentações crônicas e recorrentes ¹. A vulva costuma ser a região mais coberta do corpo, com camadas de tecidos por vezes pouco permeáveis à umidade. O contato frequente da superfície vulvar com umidade excessiva pode predispor a região a traumas, coceiras e queimação ¹. Além disso, o epitélio da vulva está frequentemente em contato com secreções vaginais, urina e resquícios fecais, sofrendo diretamente a ação desses compostos ². Práticas pouco recomendáveis, como o uso de lâminas para remoção dos pelos, perfuração para inserção de adornos (*piercings*), higienização com agentes cáusticos, infibulação e lesões iatrogênicas também podem acarretar danos à região ¹. Somem-se a estas, doenças dermatológicas, manifestações de doenças sistêmicas, doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), neoplasias benignas e malignas, estas últimas objeto deste trabalho ^{3,4}.

1.1 AS NEOPLASIAS MALIGNAS DA VULVA

O **câncer (carcinoma) da vulva** é uma neoplasia rara, representando menos de 0,6% dos tumores malignos em mulheres e 4% das neoplasias malignas do trato genital feminino ⁵. Dentre os carcinomas vulvares mais comuns estão os carcinomas de células escamosas (CEC) ou epidermóides, correspondendo a cerca de 95% das neoplasias vulvares. Os CEC são subdivididos em: basalóide, verrucoso, ceratinizante, não-ceratinizante e condilomatoso ⁶⁻¹².

O subtipo **ceratinizante** é o mais frequente, compreendendo aproximadamente 65 a 80% dos casos. Ocorre em mulheres mais velhas, geralmente após a menopausa, e possui associação menos frequente com a infecção por papilomavirus humano (HPV). São caracterizados pela presença de células escamosas com boa a moderada diferenciação, ceratinização (presença de pérolas córneas) e ausência de coilócitos ⁹. Em contraste, as características de ceratinização estão ausentes no subtipo **não-ceratinizante**, notando-se aqui agregados de células neoplásicas pouco diferenciadas.

Já os subtipos **basaloide** e **bowenoide/condilomatoso** são menos frequentes, abarcando os 20 a 35% restantes. São mais observados em mulheres jovens, no período peri- ou pré menopausa, com histórico de infecção por HPV. Estão frequentemente associadas à presença

de neoplasias intraepiteliais vulvares (VIN), as quais são diagnosticadas através da vulvoscopia e biópsia da lesão suspeita^{6,9,13}. Como características particulares, os carcinomas **basaloides** exibem crescimento de células neoplásicas em faixas dentro de um estroma desmoplásico, com citoplasma escasso e sem pérolas córneas. Os carcinomas basaloides estão associados ao HPV-16.

O subtipo **verrucoso** é raro, apresenta crescimento lento e bom prognóstico. A lesão é exofítica, exuberante, com projeções irregulares e ceratinização proeminente. Têm baixo poder metastático e estão associadas ao subtipos de HPV de baixo risco^{6,9,11,14}.

Após os CECs, o melanoma é o segundo tipo de neoplasia vulvar, compreendendo os 5% restantes. Apresenta-se como lesões mais comuns nos pequenos lábios e no clitóris. Sua incidência é estimada em 2 casos a cada 1 milhão de mulheres por ano. Embora a região vulvar corresponda a somente 0,7% de área total da superfície corporal, cerca de 2% dos melanomas femininos ocorrem nessa região, o que demonstra sua especial susceptibilidade¹⁵⁻¹⁷. Portanto, a presença de lesão pigmentada nesta região deve ser sempre investigada com cautela⁹.

Além destes, há neoplasias de tipos histológicos menos frequentes, como o adenocarcinoma, o carcinoma basocelular, a doença de Paget e os sarcomas^{18,19}.

1.2 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA VULVA (CEC)

1.2.1 Incidência

Nos países em desenvolvimento, estima-se mais de 20 milhões de novos casos de câncer até 2025^{20,21}. A incidência relatada na literatura para o câncer de vulva demonstra que esse valor varia de 1 a 4 em cada cem mil mulheres por ano (1-4/100.000 mulheres/ano). Entretanto, os números evidenciam distribuição irregular por idade, sendo 2,2 casos/100.000 mulheres/ano na faixa etária superior a 80 anos e 0,57/100.000 mulheres/ano na faixa etária de 20 a 39 anos^{6,22,23}. A incidência geral aproximada é de 4,6% a cada 5 anos, com maior frequência entre mulheres com idade superior a 70 anos^{17,24,25}. A previsão realizada pelo *National Cancer Institute* dos Estados Unidos da América²⁶ para o ano de 2020 é de cerca de 6.120 novos diagnósticos de câncer de vulva, com 1.350 novas mortes^{27,28}.

No Brasil, São Paulo tornou-se a cidade do país com o maior número de mulheres acometidas com essa neoplasia entre os anos de 2000 a 2005, apresentando 1,44 casos/100.000 mulheres/ano. As estimativas brasileiras não exibem com clareza os dados a respeito desta neoplasia atualmente. Porém, os escassos estudos sugerem um aumento em sua incidência nos últimos anos²⁹⁻³¹. Esta lacuna estatística não ocorre somente no Brasil, mas também em países

européus e na América do Norte, de acordo com dados de revisão, o que torna pouco precisa a incidência real da doença³²⁻³⁴.

1.2.2 Etiologia e Patogênese

Dentre os fatos de risco conhecidos que contribuem para o desenvolvimento da neoplasia estão: lesões associadas ao HPV, idade avançada, tabagismo, presença de líquen escleroso, imunodepressão, história de neoplasia intraepitelial e câncer cervical^{5,35-38}.

Recentemente foi proposto que o CEC vulvar apresenta duas vias etiopatogênicas distintas: uma associada ao HPV de alto risco e a outra, HPV-independente, associada ao líquen escleroso. Estas vias são caracterizadas por diferenças nas lesões precursoras, nos aspectos morfológicos, no prognóstico, nos eventos moleculares durante o processo de oncogênese e no tratamento^{23,28,39}.

A mesma linha de raciocínio envolve as lesões pré-malignas (precursoras), que predis põem ao surgimento da neoplasia: a neoplasia intraepitelial vulvar (VIN). Essas lesões têm igualmente duas vias patogênicas correspondentes às referidas acima: VIN *usual/clássica* (uVIN) e VIN diferenciada (dVIN), respectivamente relacionada à presença ou ausência de infecção pelo HPV^{19,40}.

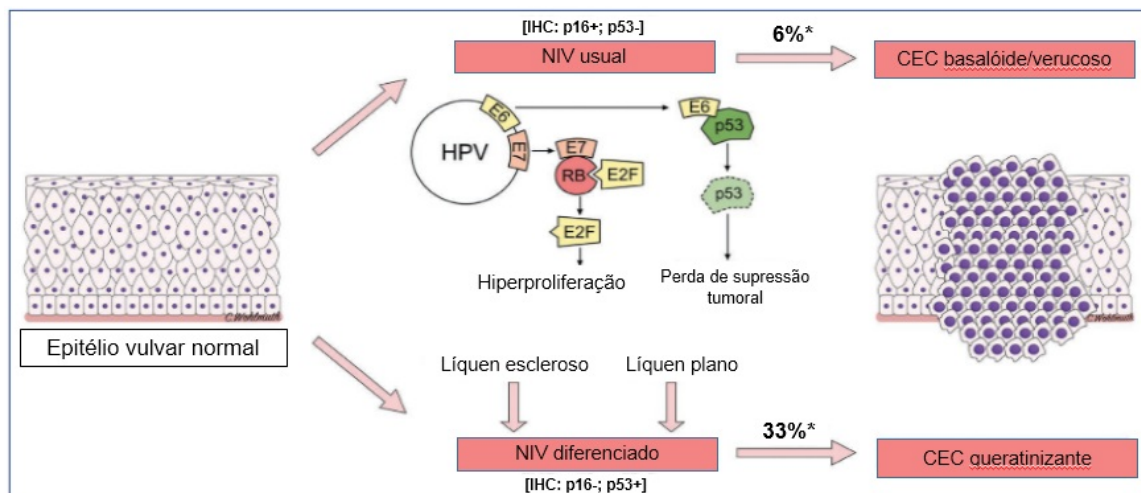
A VIN do tipo *usual/clássica* (uVIN) representa um terço dos casos e são formadas por lesões intraepiteliais escamosas de alto grau, incluindo as lesões dos tipos **condilomatosa** ou **basaloide**. Este subtipo apresenta incidência geográfica variável, todavia acomete principalmente mulheres mais jovens e detém, como causa reconhecida, a infecção persistente pelos subtipos oncogênicos de HPV de alto risco, dos tipos 16, 18, 31 e 33, principalmente^{41,42}. As lesões são multifocais e podem estar associadas a neoplasias intraepiteliais de outras partes do trato genital inferior, como colo de útero, vagina e região anal^{19,43}.

A uVIN corresponde à lesão precursora do CEC vulvar associado ao HPV de alto risco, o qual têm prevalência de 34% (IC 95% 28-39%) dentre os carcinomas vulvares, segundo revisão sistemática de Zhang et al.⁴⁴. Embora a infecção por HPV esteja envolvida na patogênese tanto da lesão precursora, quanto do carcinoma, a entidade uVIN apresenta risco reduzido de evolução para lesão invasiva^{41,42}.

Diferente das VINs do tipo *usual/clássica*, as VINs do tipo *diferenciada* (dVIN) são formadas por lesões precursoras independentes do HPV, incluindo as lesões intraepiteliais vulvares exofíticas diferenciadas e acantose com diferenciação alterada, isto é, compreende as lesões ceratinizadas ou diferenciadas³⁹. Esse grupo representa a maior parte dos casos de VIN,

acometendo cerca de 3 a 4 vezes mais mulheres com idades avançadas (entre a sétima e oitava década de vida).

A via relacionada à dVIN tem etiologia desconhecida e seus casos não apresentam relação com o tabagismo ou com a infecção por HPV. No entanto, surgem no contexto de mutações somáticas no gene TP53 e possuem conexão com processos inflamatórios crônicos como o evento inicial crítico, as quais podem atuar como promotor ou até mesmo iniciador do processo neoplásico^{6,34,35,45-47}. Dentre os processos desencadeadores têm-se a hiperplasia epitelial, distrofia vulvar e, principalmente, o líquen escleroso^{19,43,48}. De acordo com Zhang et al.⁴⁴, esse subtipo está correlacionado com uma maior taxa de invasão (**Figura 1**).



Fonte: Adaptado de Wohlmuth e Wohlmuth-Wieser⁴⁹

Figura 1 - Esquema da fisiopatologia das lesões intraepiteliais vulvares (VINs) dos tipos *usual* (uVIN) e *diferenciada* (dVIN) e sua progressão para carcinoma de células escamosas (CEC). A figura mostra a progressão sugerida de uVIN: a proteína E6 do HPV degrada o gene de supressão tumoral p53; já a proteína E7 do HPV é responsável pela inativação do gene supressor tumoral pRB, liberando E2F, o qual resulta em uma hiperproliferação celular. À imunohistoquímica, o p16 é tipicamente positivo, enquanto o p53 é negativo. Nas dVIN: as dermatoses crônicas, sobretudo o líquen escleroso e o líquen plano, podem evoluir para dVIN e CEC. À imunohistoquímica, o p16 é tipicamente negativo e o p53, positivo. (*) Taxa de progressão de acordo com van de Nieuwenhof et al.²².

A distinção entre as vias moleculares do CEC vulvar nos casos com e sem relação com HPV, estudadas através da técnica de sequenciamento (NGS, em inglês, *next generation sequencing*) foi recentemente revisada⁵⁰. Nos casos positivos para o HPV, as principais vias implicadas foram: AMPK, prolactina, mTOR e quimiocinas. Nos CEC vulvares negativos para HPV estavam implicadas as vias GnRH, neurotropina, oxitocina e NOTCH. Os casos, independentemente do status do HPV, mostravam ainda desregulação da via do PI3K-Akt, levando a alterações no ciclo celular. Estes mecanismos moleculares, confrontados com as bases de dados genéticos de interação entre drogas (em inglês, *drug gene interaction database*),

poderão servir de suporte para a busca de novas opções terapêuticas ⁵⁰. Em outro estudo de perfil gênico, os casos de carcinoma vulvar positivos para HPV apresentaram preferencialmente participação da via PI3K/Akt, enquanto que os casos negativos para HPV mostraram participação das vias de p53, TERT, CDKN2A, CCND1, EGFR e maior frequência de expressão de PD-L1 ¹².

O reconhecimento das vias moleculares do CEC vulvar e suas lesões precursoras levam a crer que podemos considerá-las duas doenças distintas do ponto de vista morfológico e biológico. No entanto, apesar dos avanços na área, a terapêutica ainda é relativamente uniforme e o conhecimento não foi acompanhado, na mesma medida, à evolução terapêutica (**Tabela 1**) ⁵¹.

Tabela 1 - Parâmetros associados ao carcinoma de células escamosas dependente e independente da infecção por Papilomavírus Humano (HPV).

	<i>HPV associado</i>	<i>HPV independente</i>
Idade	Quarta à sexta década	Quinta à sétima década
Etiologia	Infecção por HPV de alto risco	Inflamação crônica (líquen escleroso)
Precursor	uVIN	dVIN
Biomarcador associado	p16	p53
Sobrevida	Favorável	Menos favorável
Sensibilidade à radioterapia	Sensível	Menos sensível

Legendas: uVIN: neoplasia intraepithelial vulvar *usual*; dVIN: neoplasia intraepithelial vulvar diferenciada

1.2.3 Sinais e Sintomas

O CEC de vulva, muitas vezes, apresenta-se inicialmente assintomático. Segundo o NCI-USA ²⁶, 10% das pacientes são assintomáticas, podendo resultar em diagnóstico tardio e consequente impacto negativo no prognóstico. Nos casos sintomáticos podem ser observados longo histórico de prurido, dor local, ardor, corrimento vaginal, disúria, sangramento fora do período menstrual, nódulo ou ulceração e áreas da pele com cor e textura alteradas. Nos estágios avançados também são observados sintomas como dor à relação sexual (dispareunia) e nódulos na região da virilha, refletindo metástase linfonodal ^{6,9,19,47,52-54}.

Nos casos sintomáticos há maior chance de haver tratamento das lesões precursoras, através do exame clínico, vulvoscopia e, eventualmente biopsia, resultando na prevenção de progressão da doença ^{26,55}. Ainda no sentido de evitar o retardamento da busca por atendimento

médico, a conscientização das mulheres para superarem o sentimento de constrangimento ou negação parece fundamental ^{56,57}.

1.2.4 Fatores de Prognóstico

Na literatura, os dados sobre os fatores prognóstico associados às recorrências locais são, em grande parte, limitados aos fatores clínico-patológicos clássicos ⁵⁸. Entre esses fatores estão: estágio, tamanho, profundidade de invasão e a invasão do espaço vascular. Contudo, o *status* linfonodal ganhou grande importância prognóstica ⁵⁸⁻⁶³. Em contrapartida à profundidade de invasão, que aparenta ser de grande relevância para os casos de recorrência local, o status do linfonodo é o fator prognóstico considerado mais importante por diversos estudos para a sobrevida global no carcinoma vulvar ⁶⁴⁻⁶⁶.

A sobrevida do paciente é correlacionada negativamente ao status linfonodal ⁶⁷ e isso ocorre em virtude de haver chances da disseminação tumoral para linfonodos próximos e até mesmo para sítios distantes ⁶⁸. Dados recentes da literatura indicam que a taxa de sobrevida em cinco anos para pacientes com status linfonodal negativo é de 70 a 98%, enquanto para aqueles que apresentam envolvimento linfonodal metastático, essas porcentagens se reduzem abruptamente para 12 a 41% ^{66,69-71}.

A ocorrência de nódulos linfáticos positivos na virilha está intimamente relacionada ao tamanho do tumor primário e à profundidade de invasão ⁵⁶. O estadiamento (do inglês, *International Federation of Gynecology and Obstetrics-FIGO 2009*) incorporou o *status* linfonodal como fator de prognóstico ^{43,72,73}, além de outros fatores, como a dimensão das metástases, tamanho e número de linfonodos acometidos, bem como a presença de crescimento extracapsular ^{19,66,72,74}. A influência do estágio na sobrevida está resumida na **Tabela 2** ²⁸.

Tabela 2 - Taxa de sobrevida em 5 anos de acordo com o estágio do carcinoma de vulva

Estádio	Taxa de sobrevida em 5 anos
I-II: doença local, sem linfonodos comprometidos	~ 86%
III-IVA: doença regionalmente avançada, com metástases em linfonodos próximos	~ 52%
IVB: doença à distância	~ 22%

Fonte: Mantovani et al. (2020).

Embora muitos estudos tenham sido desenvolvidos buscando uma associação do HPV de alto risco e o prognóstico das neoplasias vulvares, os dados ainda são conflitantes, uma vez

que a maioria destes dados não mostra associação significativa entre HPV e prognóstico. Porém, outros estudos destacam importantes resultados clínicos favoráveis em neoplasias vulvares positivas para HPV ⁷⁵.

A resposta imune local também tem demonstrado valor prognóstico nas lesões epiteliais vulvares. Um número mais alto de células CD8+ aliado a Fox-P3 mais baixo em VIN de alto grau associado ao HPV foi relacionado a melhor prognóstico ⁷⁶. Um número aumentado de células T auxiliares intraepiteliais também foi associado a prognóstico mais favorável em CEC vulvar ⁷⁷. A expressão imunohistoquímica de CD8 e PD-L1 na região intratumoral aumentou o risco de recorrência, mortalidade global e mortalidade câncer específicas em pacientes com CEC vulvar ⁷⁸.

1.2.5 Tratamento

O tratamento é tanto mais agressivo e mutilador, quanto mais tardio for o diagnóstico e mais avançada estiver a doença. A modalidade da terapia é determinada pelo médico responsável de acordo com parâmetros como: extensão da doença, recorrência ou primariedade do tumor, histórico médico e atual estado geral de saúde ⁷⁹. Não obstante a escolha terapêutica feita pelo médico, em consonância com a opinião do paciente, outros critérios como o tamanho do tumor, invasão das estruturas perineais, comprometimento linfonodal e metástases à distância (TNM) do estadiamento proposto pela FIGO orientam a abordagem terapêutica a ser adotada ⁸⁰.

O tratamento do câncer de células escamosas da vulva pode incluir tratamentos tópicos e cirúrgicos, acompanhados por quimioterapia e radioterapia ^{40,53,62}. Historicamente, o tratamento do câncer vulvar era mais extensivo e mutilante ^{17,66,81-83}. Estes foram sendo paulatinamente substituídos por métodos menos agressivos, associados a biopsia de linfonodo sentinela quando indicado ^{17,84-89}. Assim, evitam-se os efeitos indesejados tanto da cirurgia, quanto da linfadenectomia de rotina, já que 70% das pacientes com lesão localizada têm linfonodos sentinelas negativos ^{71,90}.

Em casos mais avançados, o tratamento pode abranger uma combinação de radioterapia com quimioterapia seguida ou não de tratamento cirúrgico. Nos casos considerados avançados as opções terapêuticas são extremamente limitadas; em casos de reincidências, há ainda maiores dificuldades relacionadas aos tipos de tratamento ^{9,91}.

A exemplo de outras neoplasias, a terapia oncoginecológica tem se voltado para os benefícios atingidos pela imunoterapia, variável em diferentes tipos de neoplasias, em particular com vistas a melhorar a sobrevida em estádios mais avançados da doença ³⁸.

Em doença de Paget vulvar, a terapêutica com imiquimod levou ao aumento de células inflamatórias intraepiteliais, com fenótipos CD8+, Fox-P3+ e CD56+ ⁹². Em estudos clínicos, pacientes com VIN de alto grau relacionados ao HPV e com resposta à vacina terapêutica para HPV16 apresentaram, igualmente aos indivíduos normais, inflamação local mais exacerbada. Enquanto isto, pacientes não respondedores apresentaram depleção de células inflamatórias locais ⁹³. Aproveitando o efeito indutor da imunidade celular pelas vacinas terapêuticas para cânceres associados ao HPV, estas vêm sendo continuamente exploradas ⁹⁴.

Pode-se repetir com CLANCY et al. (2016) ⁵¹ que “*estratégias terapêuticas dirigidas a mutações alvos devem ser mais exploradas, assim como tratamentos que considerem a presença do HPV e o incremento da resposta imune do hospedeiro*”. Para tanto, é fundamental que se incentivem estudos nessas direções.

1.3 PAPEL DO PAPILOMAVIRUS HUMANO NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL

Há 5 décadas, o prêmio Nobel de Medicina de 2008, Harald Zur Hausen ⁹⁵, postulou a possível presença de DNA de um vírus oncogênico nas células neoplásicas do carcinoma do colo uterino e outros. No início da década de 1980, ele anunciou a descoberta do papilomavírus humano tipo 16 (HPV16), o qual é encontrado em biópsias de aproximadamente 70% de pacientes com câncer cervical ^{96,97}. O HPV tem sido, desde então associado a vários tipos de carcinoma, principalmente de células escamosas, como períneo, vulva, vagina, colo do útero e região anal na mulher e pênis, uretra, saco escrotal e região anal no homem. Podem ainda associar-se a tumores malignos na região da cabeça e pescoço, como no carcinoma de orofaringe e cordas vocais ⁹⁸⁻¹⁰³.

Os HPVs podem ser de baixo risco oncogênico (tipos 6, 11, 13, 32, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 55 e 63) ou de alto risco (tipos 16, 18, 31, 33 e 35). Dos 40 tipos que acometem a região anogenital, aproximadamente 18 são oncogênicos ^{75,104-106}.

O potencial carcinogênico do HPV está relacionado a duas oncoproteínas virais, E6 e E7, as quais são capazes de interagir com proteínas que regulam o ciclo celular e que interagem com os genes supressores tumorais TP53 e retinoblastoma (Rb). Essa interação provoca a degradação e inativação das proteínas celulares, o que conduziria à transformação, imortalização celular e, posteriormente, à formação de neoplasias ^{102,107-110}.

No carcinoma de vulva, a oncoproteína E7, ao inibir a proteína do retinoblastoma (pRb) regula positivamente a p14ARF que também é um importante supressor tumoral enquanto a

proteína E6, por sua vez, ao inibir a p53, regula positivamente a p16INK4a. Estas regulações resultam em uma expressão proteica exarcebada de p14 e p16 no epitélio vulvar, provenientes da infecção viral e sugerem que a degradação de p53 e pRb são acontecimentos prematuros no processo de carcinogênese vulvar ligados a via do HPV ^{108,111}. É sabido que a E6 também é responsável por ativar a telomerase, inibindo a senescência e morte celular, que leva a imortalização das células, enquanto a E7 induz a expressão de IL-1 β que ativa a expressão do modulador NF-kB, que é a peça chave para a inflamação crônica em câncer ¹¹².

Estudos recentes têm demonstrado que a vacina quadrivalente contra o HPV associa-se à redução no número de mulheres com VIN *usual/clássica*, com eficácia de 79%, reforçando a importância da vacinação de adolescentes como medida profilática ¹¹³. Esta estratégia poderá contribuir para a redução da incidência do câncer de vulva associado ao vírus ⁴⁷.

1.4 SISTEMA IMUNE E A PROGRESSÃO TUMORAL

O desenvolvimento de uma neoplasia está intimamente relacionado a diversos fatores, tais como hereditários, ambientais e acúmulo de mutação, os quais podem resultar em perda do controle celular dos processos de diferenciação e divisão, provocando, conseqüentemente, a formação de um tumor maligno ¹¹⁴. Entretanto, o sistema imunológico pode reverter esta situação identificando e destruindo as células danificadas ou pela eliminação de agentes infecciosos oncogênicos. Quando isto não ocorre, ou é insuficiente, há promoção e progressão do tumor ^{115,116}. O reconhecimento de que o microambiente tumoral, que inclui a matriz extracelular, as células inflamatórias e a angiogênese estão implicadas no mecanismo de oncogênese ¹¹⁷.

Estudos indicam que aproximadamente 25% de todas as neoplasias ocorrem devido à inflamação crônica, apontando para a relação da inflamação a redes reguladoras de genes, cujas disfunções estão associadas ao desenvolvimento do câncer ^{118,119}. Esta relação entre um processo inflamatório e neoplasias ocorre por intermédio de vias extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca, ou dependente de inflamação, condições inflamatórias podem desencadear o perfil maligno, como as relacionadas a microorganismos, doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas. Na via intrínseca, ou independente de inflamação, mutações ativam oncogenes, que criam um ambiente inflamatório em resposta à neoplasia. Em ambas as vias, a iniciação neoplásica ocorre através de ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais (anti-oncogenes) e desequilíbrio entre a proliferação e morte celular (apoptose). Já na fase de progressão da neoplasia, a inflamação fará parte do microambiente tumoral, juntamente com

processos como a angiogênese e a fibrose, através do reconhecimento dos neoantígenos, que suscitarão resposta imune com participação dos componentes celulares da imunidade inata e da adaptativa. Estes mecanismos participam igualmente do processo de metastatização ^{118,120}.

As células da imunidade inata incluem principalmente os macrófagos associados a tumores (TAM, em inglês *tumor associated macrophages*), neutrófilos e as células dendríticas. O processamento de neoantígenos tumorais por essas células e sua apresentação para os componentes da imunidade adaptativa, leva ao recrutamento de linfócitos T e B, que desenvolvem uma resposta mais específica ao tumor ¹²⁰. Células com características intermediárias, os linfócitos inatos (ILC, em inglês *innate lymphoid cells*), incluindo as células NK, também desempenham importante papel na modulação do desenvolvimento neoplásico ¹²¹. Se o sistema imune responde à presença dos neoantígenos tumorais suscitando uma resposta imune, o desenvolvimento do tumor implica em mecanismos que, de alguma forma, inativam essa resposta. Isto se dá pelos mecanismos da tolerância imunológica, que acabam por permitir o “escape” e conseqüente crescimento tumoral, chamados de “*immune checkpoints*” ¹²⁰.

A **imunidade inata** caracteriza-se por uma resposta primária e imediata e pela atividade imune semelhante (estereotipada, de certa forma) frente a variados estímulos antigênicos. A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua atuação específica, diversidade, memória, especialização, autolimitação e tolerância ¹²².

Um dos mecanismos inatos evidenciado em neoplasias é o reconhecimento de antígenos tumorais pelo **complemento**, com posterior destruição da célula neoplásica mediada por este. Este mecanismo pode ser contrabalançado pelas proteínas reguladoras do complemento ligadas à membrana celular, as quais podem reduzir o efeito da destruição celular, bem como a utilização do complemento na ativação dos linfócitos na resposta adaptativa. Outros componentes da imunidade inata, as **células NK**, reconhecem alterações sofridas pelas moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) na superfície de células tumorais. Este mecanismo reduz o reconhecimento de antígenos estranhos pelos linfócitos, inconveniente contornado por esta propriedade das células NK. **Neutrófilos** são componentes da resposta imune inata que têm duplo papel no desenvolvimento das neoplasias: por um lado, suas enzimas degradam a membrana das células tumorais, facilitando sua eliminação, mas por outro degradam a matriz extracelular facilitando a migração e invasão pelas células anômalas ¹²³.

Os **macrófagos**, igualmente, têm ação ambivalente: seu polo **M1**, relacionado a lipopolissacarídeos e interferon-gama, corresponde a uma ação pró-inflamatória; seu polo **M2**, relacionado às interleucinas 4 e 13, apresenta ação anti-inflamatória. Isto, no contexto do câncer, implica em uma ação anti-tumoral (M1), mais importante na fase de iniciação, ou pró-

tumoral (M2), mais evidente na fase de progressão. A atividade pró-tumoral dos TAMs incluem a redução da imunidade, degradação da matriz extracelular permitindo maior mobilidade e invasividade, estimulação da angiogênese e linfangiogênese e estimulação da transição epitélio-mesênquima ¹²⁰.

As **células dendríticas**, especializadas em apresentar antígenos para linfócitos T num mecanismo dependente do MHC, estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos. Representa um elo entre a imunidade adaptativa e a inata devido à sua importante participação na apresentação de antígenos para as células linfoides. Sua apresentação de antígenos para os linfócitos T podem, a depender do contexto imune e da sinalização promovida pelo meio ambiente, levar à estimulação de uma resposta T anti-tumoral, ou à tolerância ao antígeno ¹²⁰.

Uma categoria de células imunes que têm características intermediárias entre a imunidade inata e a adaptativa é constituída pelas **células linfoides inatas** (ILC, em inglês *innate lymphoid cells*). As ILCs são células com morfologia linfoide, porém que não apresentam receptores de antígenos rearranjados pelo gene ativador de recombinação (RAG), nem marcadores mieloides ou de células dendríticas. Estas células são residentes teciduais e estão presentes para respostas imunes rápidas. As ILCs são derivadas de precursors linfoides comuns e podem ser divididos em três grupos que espelham os perfis de citocinas dos subtipos CD4+ Th1, Th2 e Th17, enquanto as células tipo NK representam a contrapartida de células T CD8+ citotóxicas, com expressão de perforina e granzimas. As ILCs podem ser divididas em três grupos: (1) ILC tipo 1, produtoras de interferon-gama (IFN) e TNF-alfa em resposta a citocinas tais como IL12 e IL18; este grupo mostra expressão de T-bet e é constituído por elementos pouco citotóxicos e pelos elementos NK, de alta citotoxicidade; (2) ILC tipo 2 são predominantemente residentes em tecidos e produzem IL4, 5, 9, 13 e anfi-regulinas em resposta a IL25 e IL33; (3) ILC tipo 3 medeiam imunidade a bactérias e alguns fungos, são dependentes de ROR-gama-t e produzem IL17A e IL22 em resposta a IL1b e IL23. Estas células apresentam ampla plasticidade e têm sido estudadas em vários processos inflamatórios. Seu papel na imunidade tumoral ainda é pouco conhecido, porém as evidências atuais mostram que, a depender de seu estado de ativação, possam exercer papel anti- ou pró-tumoral ¹²¹.

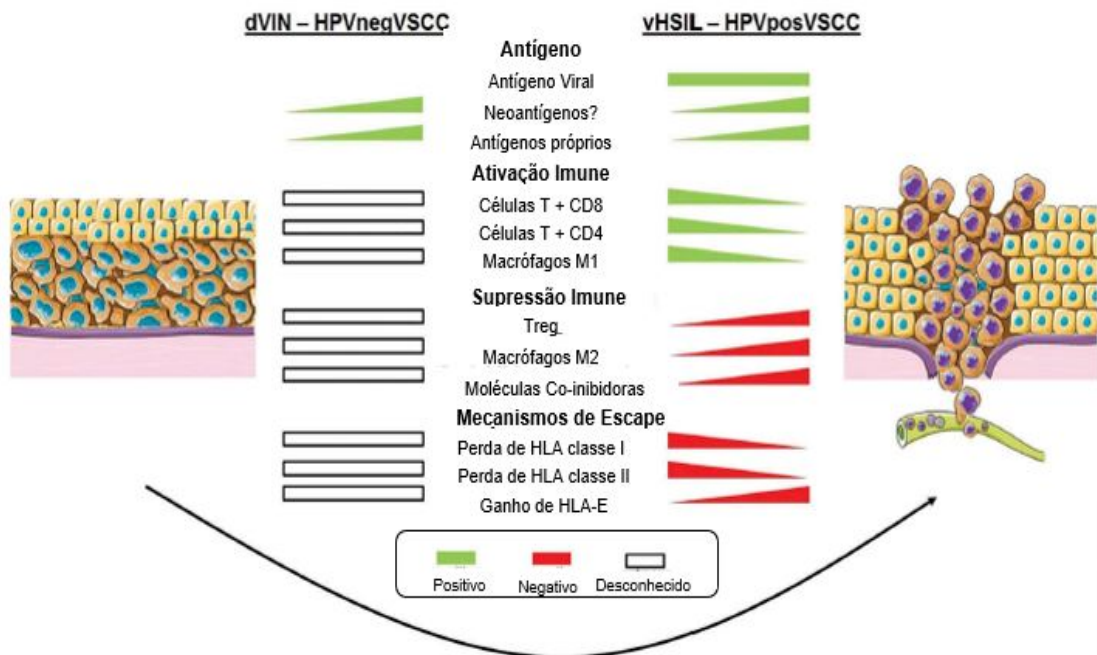
A **imunidade adaptativa** é representada pelos linfócitos B e T, com suas subpopulações. Estes elementos agem em estreita relação com os componentes da resposta imune inata e, como estes, podem exercer efeitos anti- e pró-tumorigênicos, a depender da fase de desenvolvimento do tumor e do estado da relação tumor-hospedeiro. Assim, na fase de eliminação, quando células neoplásicas são eliminadas pelo sistema imune, há predomínio da atividade Th1 das células T-CD4+ e da atividade citotóxica dos linfócitos T-CD8+, através de

seus grânulos citotóxicos (granzima, perforina). Estas atividades são mediadas por células apresentadoras de antígeno dependentes dos antígenos do sistema MHC classe 2 e classe 1, respectivamente para as células T CD4⁺ e CD8⁺ ^{120,123}.

Após uma fase de equilíbrio entre tumor e hospedeiro, pode haver evolução para a fase de escape, na qual o sistema imune assume franca atividade pró-tumoral. Nesta fase há hipoexpressão de antígenos do sistema MHC, recrutamento de células T CD4⁺ regulatórias e de mecanismos de supressão e exaustão da atividade de linfócitos T CD8⁺ através do mecanismo de checkpoints, representado principalmente pelas moléculas CTLA4 e PD1. Estes mecanismos são importantes para a terminação da resposta imune a estímulos, como ao final de processos infecciosos e inflamatórios, no entanto, acabam permitindo a evasão da célula tumoral à vigilância imune. Uma das formas de contornar este mecanismo é através da terapêutica com anticorpos para esses marcadores, CTLA4 e PD1, ou seu ligante, PD-L1. Para indicação deste último, utiliza-se a pesquisa imunohistoquímica desta molécula nas células tumorais e/ou inflamatórias relacionadas ao tumor, para se atingir maior probabilidade de resposta a este tipo de terapia ^{120,123}.

1.5 LESÃO INTRAEPITELIAL VULVAR, CARCINOMA DE VULVA, HPV E IMUNIDADE LOCAL

Em revisão de 16 estudos feitos em pacientes com lesões precursoras da vulva (VIN) e que foram tratadas com imunoterapia, foi constatado que apenas seis foram acompanhados de avaliação do microambiente celular imune ⁹³. Como tendência geral, nos casos de lesões precursoras de alto grau em progressão para CEC vulvar relacionados ao HPV houve incremento de neoantígenos, redução de células CD8⁺ e CD4⁺ e de macrófagos M1. Ao contrário, essa progressão foi acompanhada de incremento de células T regulatórias, macrófagos M2 e de moléculas corregulatórias. Mecanismos de escape à vigilância imune (redução da expressão de antígenos HLA classes 1 e 2) também acompanharam a progressão de VIN de alto grau para CEC vulvar. Porém, faltam dados para os casos não relacionados ao HPV (**Figura 2**).



Fonte: Adaptado de Abdulrahman et al. (2018)

Legendas: dVIN= neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada; HPVneg: casos não relacionados ao HPV; vHSIL= lesão intraepitelial de alto grau associado ao HPV; HPVpos= positivo para HPV.

Figura 2 - Resumo esquemático contendo a literatura sobre o microambiente do carcinoma escamoso da vulva (CEC) e seus precursores.

Em estudo anterior nosso grupo estudou o papel do infiltrado inflamatório na progressão das lesões precursoras e no carcinoma invasivo da vulva, seu valor prognóstico no carcinoma e seu comportamento em relação ao status do HPV¹²⁴. O estudo foi realizado no A.C.Camargo Cancer Center, com um total de 110 pacientes diagnosticados entre 1980 e 2013, cujos tecidos parafinados foram coletados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da instituição. Desse total de pacientes, 21 apresentavam NIV de baixo grau (NIV BG), 45, NIV de alto grau (NIV AG) e 44, carcinoma invasivo (CAI). A caracterização morfológica do infiltrado inflamatório foi feita em lâminas coradas rotineiramente com H&E. O fenótipo dos tipos celulares foi determinado por imunohistoquímica e sua quantificação foi efetuada através da captura e análise de imagens no sistema APERIO®. Foram analisadas regiões *hotspot* peri- e intratumorais (CAI P e CAI I) para cada tumor invasivo. A informação sobre o status do HPV nos casos de CAI (19/44, ou 43,2%) havia sido determinada em trabalho anterior na instituição e serviu para a comparação do infiltrado inflamatório segundo o status viral das lesões. Foi evidenciado que a quantidade de linfócitos e plasmócitos aumentou gradativamente na progressão de lesões precursoras até CAI. No CAI I, a maior densidade de linfócitos associou-se com menor profundidade de invasão ($p=0,010$) e ausência de invasão vascular ($p=0,008$), ao

passo em que a maior densidade de plasmócitos associou-se com ausência de metástase linfonodal ($p=0,033$). Intensidades mais altas de células positivas para CD3 e CD8 no CAI I associou-se com menor profundidade de invasão ($p=0,004$ e $p=0,039$, respectivamente). A presença de maior número de linfócitos positivos para FOXP3 no CAI I associou-se com menor profundidade de invasão ($p=0,011$), ausência de invasão vascular ($p=0,030$) e perineural ($p=0,026$). Em CAI P, este parâmetro associou-se com ausência de invasão vascular ($p=0,016$). Além disto, a expressão mais pronunciada destes marcadores associou-se com sobrevida câncer específica e livre de doença mais favorável. Baixas quantidades de linfócitos CD4+ contribuíram para uma sobrevida global e câncer específica mais favorável. Por fim, foi observada maior quantidade de células CD4+ nas regiões peri- e intratumorais e de CD8+ intratumoral nas lesões positivas para o HPV ($p=0,007$; 0,048 e 0,035).

Dando continuidade ao estudo destas pacientes, objetivamos ampliar o número de populações celulares do infiltrado inflamatório associado ao CEC vulvar. No presente trabalho, abordaremos as seguintes populações:

- macrófagos, através do marcador para CD68;
- células T/NK, através do marcador para CD56;
- células citotóxicas, através de marcadores para granzima B e perforina (grânulos citotóxicos estão presentes particularmente em linfócitos T CD8+ e células NK, porém podem ocorrer em alguns linfócitos T CD4+, em particular do tipo Th1 e Treg);
- células dendríticas tipo Langerhans, através de marcadores para proteína S100 e CD1a (estas células estão presentes em particular na pele, como tipo especializado de células apresentadoras de antígeno);
- marcador de inibidor de *checkpoint*, PD-L1.

Esta proposta se justifica devido ao microambiente peri e intratumoral serem relativamente pouco estudados no carcinoma epidermoide da vulva, uma vez que a neoplasia é relativamente rara. No entanto, nos últimos anos tem se notado um aumento do número de casos, principalmente em locais onde a população sofre com os efeitos do baixo padrão socioeconômico, com hábitos de higiene sexual precários, reduzida adesão à vacina profilática da infecção pelo HPV e procura tardia dos serviços médicos, quando a lesão já está mais avançada. Nestes casos, os tratamentos tradicionais têm eficácia limitada, sendo necessário o conhecimento da biologia tumoral e sua relação com a imunidade, para que se possa abrir um leque maior de opções terapêuticas.

Assim, o presente estudo visa acrescentar conhecimento aos trabalhos já existentes, incluindo o de nosso grupo, nos CECs vulvares, sua relação com o HPV e o comportamento do infiltrado inflamatório peri e intratumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar de componentes celulares do infiltrado inflamatório peri e intratumoral, com marcadores dirigidos principalmente à imunidade inata, e relacioná-los ao CEC da vulva, a sua progressão e ao status do HPV. Adicionalmente, objetivamos avaliar a expressão proteica do PD-L1 em sua relação com a progressão da doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Caracterizar o infiltrado inflamatório associado ao tumor em pacientes com carcinoma invasivo da vulva, identificando as principais proteínas relacionadas à imunidade inata nas regiões peri e intratumoral, de acordo com o status do HPV;
- 2 Correlacionar os parâmetros clínico-patológicos com o prognóstico em CEC HPV *independente* e HPV *associado*;
- 3 Relacionar o status do HPV com o perfil de expressão das proteínas estudadas;
- 4 Verificar a relação entre a imunexpressão proteica e o comportamento biológico dessas lesões nas duas vias;
- 5 Associar as características clínico-patológicos com as sobrevidas;
- 6 Identificar a relação entre características clínico-patológicas, sobrevida e status do HPV no prognóstico da doença;
- 7 Correlacionar a imunexpressão de PD-L1 no carcinoma vulvar com o status do HPV e com parâmetros indicativos do comportamento biológico dessas neoplasias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Amostras de tecido fixados em formalina e incluídos em parafina, provenientes de pacientes com diagnóstico de carcinoma da vulva entre 1980 e 2014 foram selecionadas retrospectivamente do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center de São Paulo. Foram obtidas 44 amostras, sendo 25 pacientes com carcinoma de células escamosas do tipo *diferenciado* (HPV *independente*) e 19 amostras do tipo *usual/clássico* (HPV *associado*). As amostras corresponderam a neoplasia provenientes de intervenção cirúrgica ou por biopsia.

A busca por pacientes elegíveis para o estudo foi realizada a partir da análise dos prontuários médicos inseridos na plataforma institucional. Todos os casos foram revisados por três patologistas para confirmação diagnóstica (Dr. José Vassallo, Dra. Mônica Maria Ágata Stiepcich e Dra. Louise de Brot Andrade).

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os materiais degradados pela ação do tempo, insuficientes para as análises e aqueles que apresentaram informações clínicas incompletas. Assim, dos 100 casos inicialmente encontrados na plataforma institucional, 56 foram excluídos por falta de tecido arquivado e/ou por dados clínicos insuficientes. Restaram, então, os 44 casos referidos acima.

3.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

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

tabela no programa Excel, inseridos no banco de dados da instituição (*redcap*) e utilizados nas análises estatísticas.

3.4 IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM DO HPV

Os dados acerca da identificação e tipagem do HPV das quarenta e quatro amostras de tecido parafinado foram coletados nos bancos de dados de nossos colaboradores ¹²⁵. A detecção e tipagem do papilomavírus humano fora anteriormente realizada no projeto mencionado anteriormente, utilizando-se os kits *DNA FFPE* (Qiagen, Valência, CA, EUA) para extração do DNA em tecido parafinado, e o kit *Linear Array (LA) HPV genotyping test* (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Essa metodologia se baseia na amplificação do DNA alvo por reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR) utilizando iniciadores para mais de 37 tipos de 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). Além disso, o ensaio inclui iniciadores β -globina (amplicon 150-bp) detectados na tira de tipagem de HPV como controle positivo para amostra de DNA amplificável. As tiras de genotipagem de HPV foram interpretadas manualmente usando o guia de referência do HPV fornecido pelo fabricante. Os produtos da hibridização foram detectados por uma reação colorimétrica com conjugado fosfatase alcalina-estreptavidina e substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e nitrobluetetrazólio), que resulta em um precipitado roxo. Os resultados da hibridização foram avaliados visualmente por comparação com a grade padrão.

Dos quarenta e quatro casos selecionados, dezenove deles apresentam positividade para o HPV (43,1%), os quais serão apresentados nos resultados.

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para o estudo imunohistoquímico foram realizados cortes de quatro micrômetros de espessura dos blocos referentes aos casos previamente selecionados e dispostos em lâminas silanizadas StarFrost® (Light Labs, Dallas, TX, USA). As reações foram feitas manualmente e as etapas de desparafinização e recuperação antigênica foram realizadas sob alta pressão, em panela elétrica Cuisinart® (Hampshire, UK), contendo uma solução de recuperação antigênica Trilogy® (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) diluída a 1:100 em água destilada, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, o material foi transferido para uma cuba contendo uma nova solução

Trilogy® por 5 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas ficaram mergulhadas por 10 minutos em solução de água oxigenada 10V, seguidos por banhos de água corrente, de água destilada e de PBS na concentração de 1x por 2 minutos cada. Em seguida, os cortes de tecido foram incubados a temperatura ambiente por uma hora com os anticorpos primários relacionados na Tabela 3. Após a realização de dois banhos de 2 minutos em solução tampão PBS 1x, foi realizada a incubação com o amplificador para coelho/camundongo (HiDeF Detection HRP system®, Cell Marque Tissue Diagnostics) por 10 minutos, seguidos de dois banhos com tampão PBS 1x e posteriormente a incubação com o polímero de detecção (HiDeF Detection HRP system®, Cell Marque Tissue Diagnostics) por 10 minutos. Após realizadas as lavagens em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – Cell Marque®, Cell Marque Tissue Diagnostics) por 10 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente, contracoradas com hematoxilina filtrada por 40 segundos, lavadas em água corrente e banhados no diferenciador por 40 segundos. Por fim, as lâminas foram desidratadas em álcool, xilol e montadas em equipamento automatizado Tissue-Tek® Prisma®/Film® (SAKURA FINETEK, Torrance, CA, USA).

Tabela 3 - Anticorpos primários, clones, fabricantes, diluições e padrões de marcação utilizados nas reações de imunohistoquímica (IHC).

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Padrão de Marcação
PDL-1	ab205921	Abcam®	1:50	Membrana
CD68	KP1	Abcam®	1:200	Citoplasma
CD56	ERP2566	Abcam®	1:200	Membrana
Granzima B	EPR8260	Abcam®	1:100	Citoplasma
Perforina	5B10	Abcam®	Puro	Citoplasma
CD1a	O10	Dako®	1:200	Membrana
S100	Z0311	Dako®	1:400	Citoplasma/Núcleo

Abcam, Cambridge, MA, USA; Dako-Agilent, Santa Clara, CA, USA.

3.6 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas imunocoradas foram digitalizadas no equipamento APERIO® (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA), no aumento de 40x. Posteriormente, a avaliação da reação de imunohistoquímica foi realizada de forma automatizada utilizando-se o programa de patologia digital ImageScope® (Scope, APERIO®, Leica Biosystems). Esta ferramenta efetua a análise das imagens a partir da seleção dos campos representativos do tumor determinados

pelo pesquisador. Foram escolhidas cinco áreas *hot spots* aleatoriamente do infiltrado inflamatório em regiões peri- e intratumorais.

Para a avaliação dos campos escolhidos, foram utilizados os algoritmos do programa para os padrões de marcação característicos de cada marcador, que constam da Tabela 3. Desta forma, foi utilizado o algoritmo de marcação “IHC nuclear®/Citoplasm” para CD68, proteína S100, Granzima B e Perforina e o algoritmo de marcação “Membrane®” para CD1a, CD56 e PDL-1. Em cada caso, foi determinada a intensidade de marcação e a porcentagem de células marcadas.

Para balancear a porcentagem de células marcadas com a intensidade de marcação, foram calculados os respectivos valores do HSCORE (equação abaixo). Os valores do HSCORE variam, então, de 0 a 300. Para as análises estatísticas e de sobrevida, valores iguais ou maiores que a mediana, foram considerados positivos (**alta expressão ou moderada/intensa**) em contraste com os valores inferiores a ela (**negativo ou baixa expressão**).

$$HSCORE = \sum(i \cdot P_i), \text{ em que } P_i = \text{porcentagem de pixels positivos, variando de 0 a 100\% e } i = \text{intensidade da coloração [podendo ser } i = 0-1 \text{ (fraco), 2 (moderado) ou 3 (intenso)]}.$$

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Os dados foram submetidos à análise estatística no departamento de Bioestatística da instituição. As análises estatísticas foram realizadas através do software “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 25. Foi realizada análise descritiva dos dados, na qual foram calculadas as distribuições de frequência absoluta e relativa (variáveis qualitativas) e as principais medidas, como média, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo (variáveis quantitativas). O teste de Wilcoxon foi adotado para verificar as associações entre as regiões peri e intratumoral do infiltrado inflamatório em relação aos marcadores estudados. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para verificar associações entre a expressão dos marcadores de inflamação (CD68, CD56, granzima B e perforina, S100, CD1a)m como as características clínicas e anatomopatológicas. Para a determinação das sobrevidas foram realizadas as curvas de Kaplan-Meier. O teste de Log-Rank foi adotado para testar a significância das diferenças entre as funções de sobrevida. As

associações que apresentaram valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center, processo nº 2161/16.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRAFICOS E CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Os dois grupos avaliados neste estudo foram constituídos por amostras de classificação distinta; assim, temos uma coorte, representado pelo grupo 1 que compreende: 25 pacientes com carcinoma de células escamosas de vulva do tipo HPV *independente* (HPV *independente*); enquanto a outra coorte, do grupo 2, com 19 amostras de carcinoma de células escamosas de vulva, caracterizando o tipo HPV *associado* (grupo B) (HPV *associado*). A média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo de idades estão apresentados na **tabela 4**.

Conforme a divisão estabelecida na literatura que embasa a diferenciação do carcinoma vulvar em duas vias etilógicas distintas em CEC HPV *associado* e CEC HPV *independente*, as funções foram realizadas de acordo com essa divisão. Assim, de uma forma geral, para o CEC de vulva é observada que média de idade das pacientes do presente estudo é de 69,8 anos (desvio padrão:14,4) (**Tabela 4**). Ao passo que, com a distinção das vias, a média das idades foi de 65,1 anos para o tipo HPV *associado* (desvio padrão: 17,2) e 73,7 para o tipo HPV *independente* (desvio padrão: 10,5) (**Tabela 4**), coerente com os dados presentes na literatura para esse tipo de carcinoma.

Tabela 4 - Média, desvio padrão, mediana, máximo e mínimo das idades (em anos) de CEC de vulva de modo geral e dos grupos CEC HPV independente e dependente

Tipo histológico	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo e máximo
CEC de vulva geral	69,8	14,4	73	14 - 98
CEC HPV <i>independente</i>	73,71	10,58	74	48 - 98
CEC HPV <i>associado</i>	65,11	17,29	69	14 - 87

A **Tabela 5** fornece os dados obtidos por nossos colaboradores, indicando os subtipos virais de HPV presentes nas amostras da via HPV *associado*. É possível verificar o predomínio de casos de infecção com os subtipos de HPV considerados de alto risco (HPV 16, 18 e 33), em 84,22% das amostras, ao passo que apenas 15,78% dos casos apresentaram infecção com tipos considerados de baixo risco oncogênico. Além disso, há casos em que ocorre coinfeção por tipos virais distintos, correspondendo a 23,32% dos casos versus 73,68% que apresentaram

apenas um subtipo viral.

Tabela 5 - Subtipos virais identificados nas amostras de carcinoma de células escamosas (CEC) vulvar do tipo *HPV associado*, separando em alto e baixo risco.

<i>Amostra</i>	<i>Tipagem do HPV</i>	
	Alto risco	Baixo risco
1	HPV 16, 18 e 33	-
2	HPV 31, 33 e 82	-
3	HPV 33	-
4	HPV 69	-
5	HPV 54	HPV 42
6	HPV 67	-
7	HPV 53	-
8	HPV 16	-
9	HPV 53	-
10	HPV 18	-
11	HPV 33	-
12	HPV 16	-
13	HPV 16, 33	HPV 84
14	HPV 16	-
15	HPV 16, 33 e 35	-
16	HPV 35	-
17	HPV 16	-
18	-	HPV 42
19	HPV 16	-

Os dados demográficos e clínico-patológicos das amostras utilizadas nas análises de imunohistoquímica estão dispostos nas **Tabelas 6**. Nessa tabela estão evidenciados os dados da via de CEC HPV *independente* e de CEC do tipo *HPV associado*. As características clínico-patológicas foram analisadas quanto ao tabagismo, fator de risco sabidamente reconhecido na literatura para esse tipo de neoplasia. Evidenciou-se que 72% das pacientes não mantinham hábitos tabagistas em CEC do tipo HPV *independente* e em CEC HPV *associado*, 68,4% não fumavam. Em relação à profundidade de invasão, em CEC HPV *independente* 40% infiltraram a derme superficial e 52% dos tumores infiltraram a derme profunda; já nos casos de CEC HPV *associado* 52,6% dos tumores invadiram a derme superficial e 47,4%, a derme profunda. Na maioria dos casos não foram relatadas invasão vascular (76% em CEC HPV *independente* e 68,4% em CEC HPV *associado*) ou perineural (72% em CEC HPV *independente* e 78,9% nos CEC HPV *associado*). A ausência de invasão perineural e vascular concomitantemente também foi predominante, sendo 72% em CEC HPV *independente* e 68,4 em CEC HPV *associado*. No

que diz respeito à metástase linfonodal, há um predomínio de ausência de informação (44% para CEC HPV *independente* e 47,4% para HPV *associado*), entretanto, apesar dessa lacuna, para os casos relatados de presença e ausência, é observado maior número de casos que não apresentaram linfonodos acometidos (32% em CEC HPV *independente* e 31,6 em CEC HPV *associado*) do que casos que apresentaram algum grau de acometimento linfonodal. Ademais, em nossa casuística a maior parcela dos casos apresentaram estágio I e II tanto nos CEC HPV *independentes* (60%), quanto no HPV *associado* (52,6%).

Tabela 6 - Caracterização demográfica e clínico-patológica de CEC de vulva dos tipos HPV *independente* e HPV *associado* utilizados nos experimentos de imunohistoquímica.

Parâmetro	Categoria	HPV <i>independente</i> (n=25)		HPV <i>associado</i> (n=19)	
		N	%	Nº	%
Tabagismo	Não	18	72	13	68
	Sim	1	4	6	31
	Sem informação	6	24	0	0
Profundidade de invasão	Derme superficial e média	10	40	10	52
	Derme profunda e subcutânea	13	52	9	47
	Sem informação	2	8	0	0
Invasão vascular	Ausente	19	76	13	68
	Presente	4	16	4	21
	Sem informação	2	8	2	10
Invasão perineural	Ausente	18	72	15	78
	Presente	4	16	3	15
	Sem informação	3	12	1	5
Invasão vascular + perineural	Ausente	18	72	13	68
	Presente	6	24	5	26
	Sem informação	1	4	1	5
Metástase linfonodal	Ausente	8	32	6	31
	Presente	6	24	4	21
	Sem informação	11	44	9	47
Estadiamento FIGO	I e II	15	60	10	52
	III e IV	9	36	8	42
	Sem informação	1	4	1	5

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS CD56, CD68, GRANZIMA B, PERFORINA, S100, CD1A E PD-L1 NO CEC HPV INDEPENDENTE E HPV ASSOCIADO DA VULVA

Os valores medianos de expressão dos marcadores de células do sistema imunológico presentes em cada um dos dois grupos estudados estão apresentados na **Tabela 7**. É possível notar que as expressões de CD68, Granzima B, Perforina, S100 e PD-L1 são maiores se essas células estão localizadas na região ao redor do tumor (peritumoral) em CEC do tipo HPV *independente*. Todavia, CD1a parece estar mais expressa na região intratumoral, contrariando o padrão das demais células nessa via. Em CEC HPV *associado* as expressões de CD68, granzima B, perforina, S100 e PD-L1 foram mais intensas na região peritumoral, enquanto CD1a manteve o comportamento similar ao apresentado na outra via, com sua expressão intensa na região intratumoral. Além disso, o comportamento de CD56 nessa via foi ao contrário do observado na outra via, aumentando sua expressão na região intratumoral.

Tabela 7 - Valores medianos da expressão dos marcadores de células inflamatórias das regiões peri e intramural de CEC dos tipos HPV independente e HPV *associado*

	CEC HPV <i>independente</i> (n=25)		CEC HPV <i>associado</i> (n=19)	
	Peritumoral	Intratumoral	Peritumoral	Intratumoral
CD56	100,5 (0,83 – 177,0)	75,5 (0,53 – 161,3)	62,3 (21,4 – 166,3)	74,7 (8,45 – 158,1)
CD68	110,3 (0,96 – 189,4)	78,2 (0,44 -228,6)	102,1 (47,7 – 200,9)	94,5 (8,10 – 147,1)
Granzima B	17,8 (3,57 – 120,7)	3,80 (0,05 – 74,3)	30,8 (0,71 – 179,8)	12,1 (0,43 – 61,5)
Perforina	88,0 (14,1 – 169,3)	53,3 (2,57 – 128,9)	39,5 (0,73 – 160,1)	18,4 (0,12 – 96,7)
S100	165,5 (131,9 – 207,2)	147,4 (118,6 - 178,0)	173,4 (118,4 – 235,1)	161,5 (114,9 – 201,4)
CD1a	26,6 (1,86 – 141,8)	59,8 (6,54 – 157,7)	19,2 (3,17 – 56,9)	48,8 (1,72 – 126,5)
PD-L1	90,8 (33,5 – 135,9)	58,3 (60,5 – 114,20)	84,6 (20,4 – 136,0)	71,7 (9,09 – 100,5)

Nas **Figuras 3, 4 e 5** estão dispostos os gráficos boxplot que evidenciam os valores das medianas das expressões para cada marcador comparados entre os grupos de CEC HPV

independente versus HPV associado e entre as regiões peri e intratumoral. Estatisticamente, apenas o marcador de células inflamatórias perforina apresentou valores significativos quanto a diferença na expressão entre os grupos HPV *independente* e HPV *associado*. Além disso, essa diferença foi observada tanto na expressão em região peri ($p=0,004$), quanto intratumoral ($p=0,021$). Ademais, os outros marcadores apresentaram pequenas diferenças (sem significância estatística) quanto às expressões nos diferentes grupos e nas duas regiões analisadas.

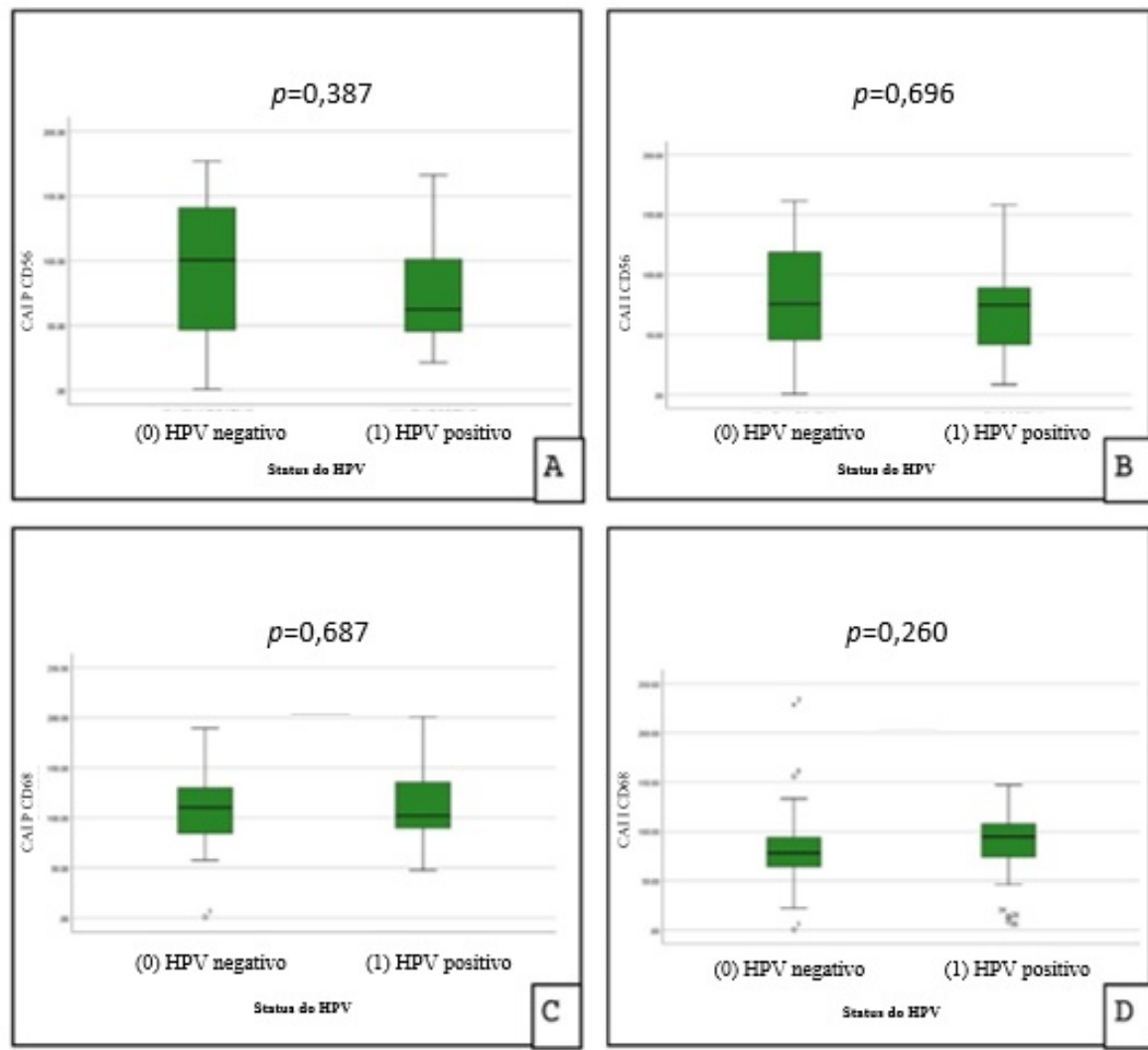


Figura 3 - Comparação entre os CEC HPV *independente* e HPV *associado* com as expressões dos marcadores CD56 e CD68 das as regiões peri (CAI P) e intratumoral (CAI I). (A) CAI P CD56; (B) CAI I CD56; (C) CAI P CD68 e (D) CAI I CD68. Estatisticamente significativo: $p<0,05$.

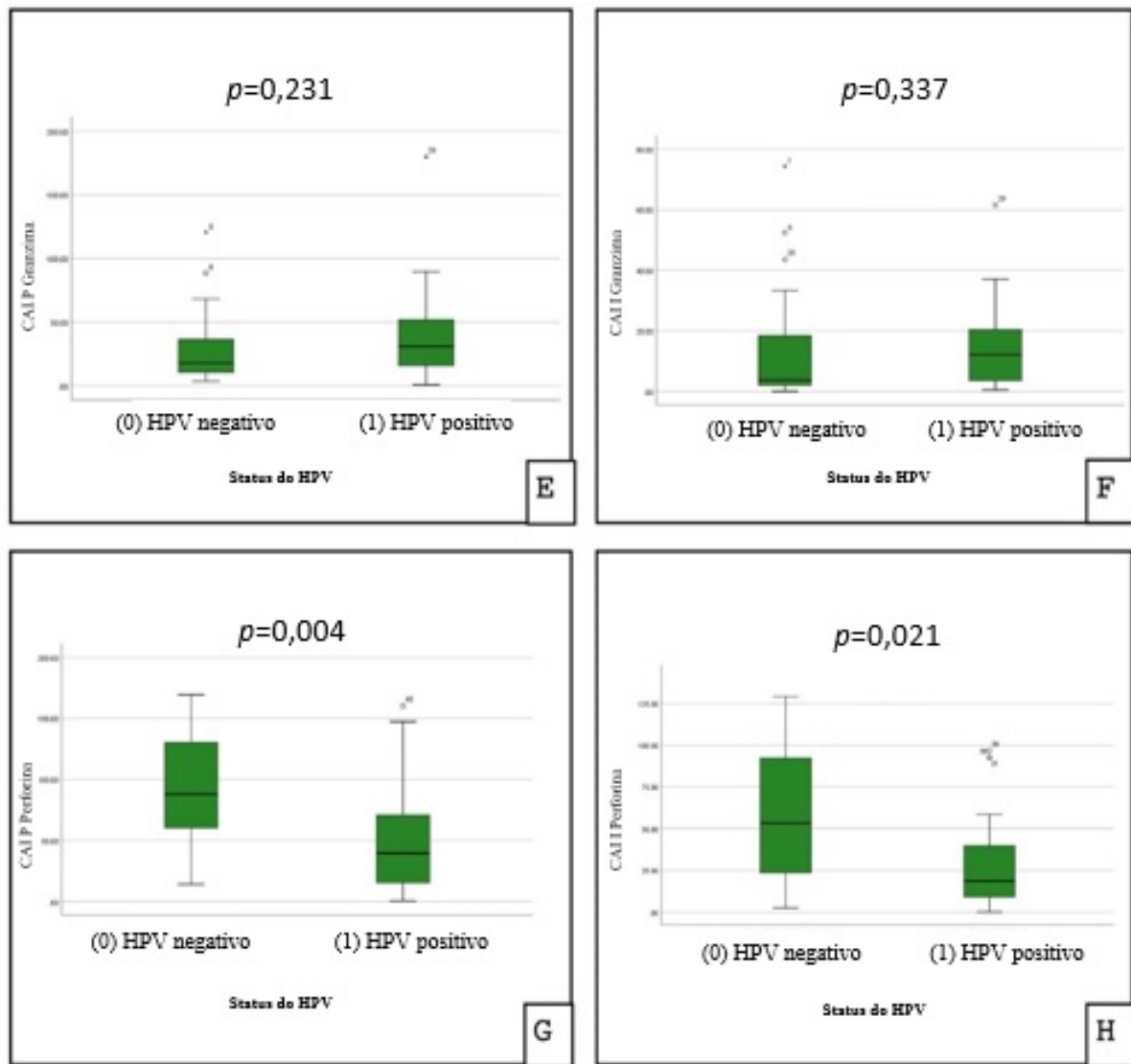


Figura 4 - Comparação entre os CEC HPV *independente* e HPV *associado* com as expressões dos marcadores Granzima B e Perforina das as regiões peri (CAI P) e intratumoral (CAI I). (E) CAI P Granzima B; (F) CAI I Granzima B; (G) CAI P Perforina; (H) CAI I Perforina. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

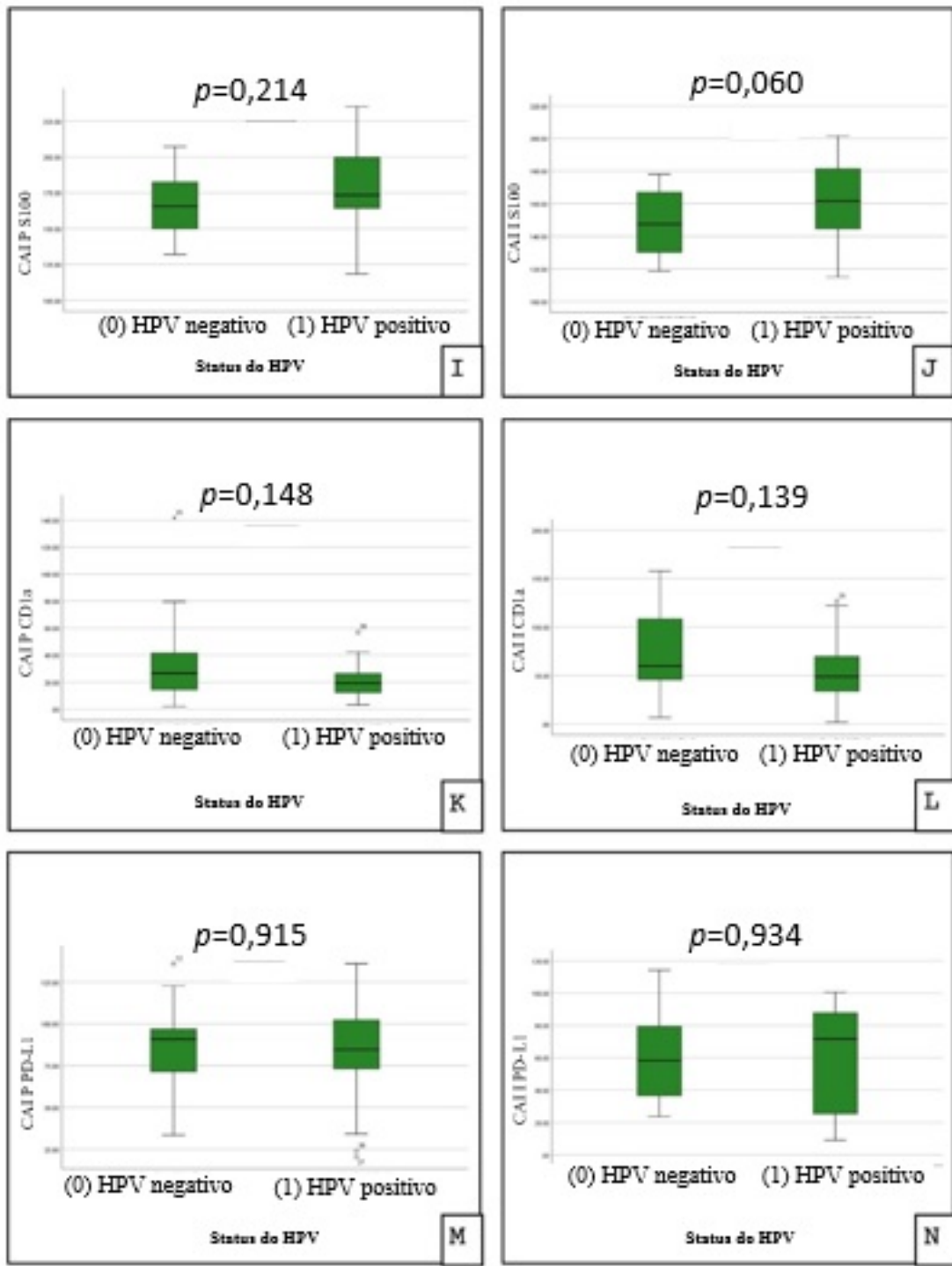


Figura 5 - Comparação entre os CEC HPV *independente* e *HPV associado* com as expressões dos marcadores S100, CD1a e PD-L1 das as regiões peri (CAI P) e intratumoral (CAI I). (I) CAI P S100; (J) CAI I S100; (K) CAI P CD1a; (L) CAI I CD1a; (M) CAI P PD-L1; (N) CAI I PD-L1. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$

Nas **Figuras 6 e 7** estão apresentadas imagens representativas dos casos estudados a qual ilustram o padrão de marcação dos antígenos nos casos de CEC HPV *independente* e o gráfico da comparação entre expressões das regiões peritumorais *versus* (vs.) intratumoral. Apenas o marcador CD56 não apresentou associação significativa entre as expressões na região peri *versus* intratumoral. Todos os demais marcadores (CD68, Granzima, PDL-1, Perforina, S100 e CD1a) tiveram associação estatística ($p < 0,05$) entre as diferentes regiões de expressão das proteínas, sendo a região de predomínio dessas células inflamatórias, a peritumoral, com exceção de CD1a, que apresentou maior número dessas células na região intratumoral.

As **Figuras 8 e 9** ilustram imagens representativas dos casos de CEC do tipo HPV *associado* estudados e a comparação entre as diferenças nas expressões das regiões peri e intratumoral. Novamente foi constatado que apenas CD56 não apresentou associação estatística entre a diferença nas expressões da proteína das duas regiões; entretanto, associações estatísticas relacionadas às diferenças de expressões entre as regiões foram observadas em todos os demais marcadores, sendo que apenas CD1a apresentou maior expressão na região intratumoral, enquanto CD68, granzima B, perforina, S100 e PD-L1 apresentaram predomínio de expressão da região peritumoral.

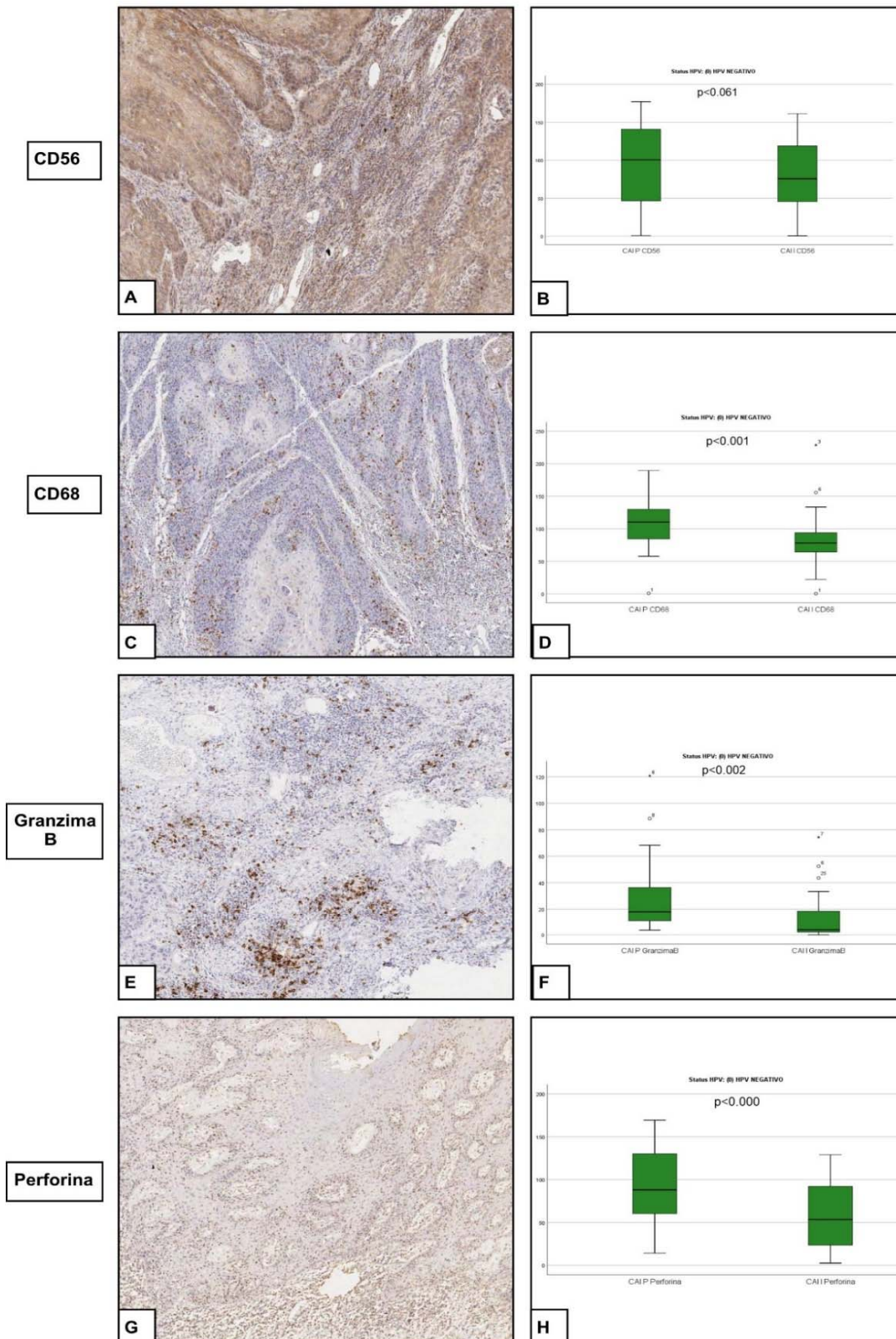


Figura 6 - Marcação imunohistoquímica de CD56, CD68, Granzima B e Perforina e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV negativos. (A) marcação peri e intratumoral de CD56; (B) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de CD56; (C) marcação peri e intratumoral de CD68; (D) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de CD68; (E) marcação peri e intratumoral de granzima B; (F) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de Granzima B; (G) marcação peri e intratumoral de perforina; (H) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de Perforina. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

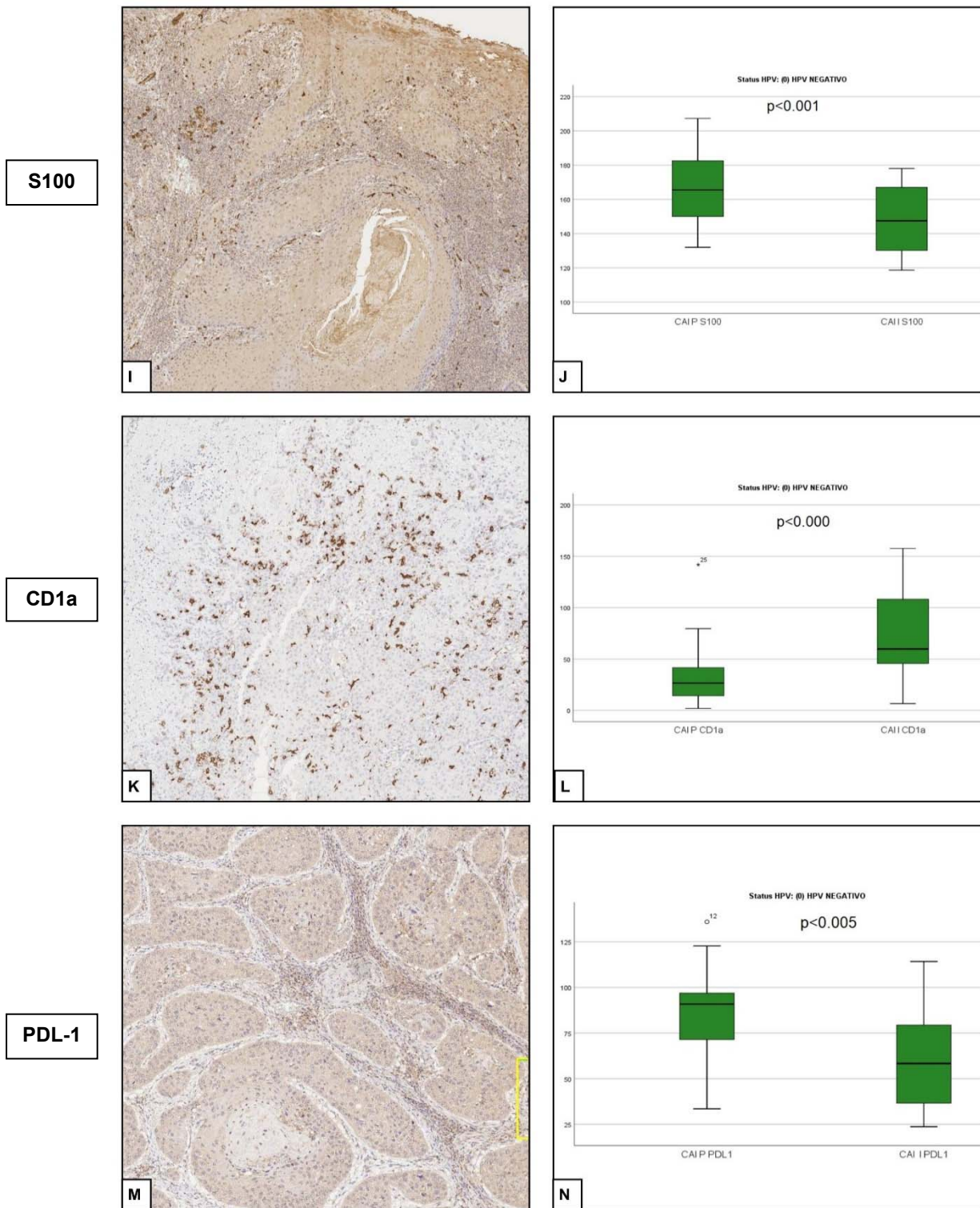


Figura 7 - Marcação imunohistoquímica S100, CD1a e PD-L1 e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV negativos. (I) marcação peri e intratumoral de S100; (J) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de S100; (K) marcação peri e intratumoral de CD1a; (L) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de CD1a; (M) marcação peri e intratumoral de PD-L1; (N) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de PD-L1. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

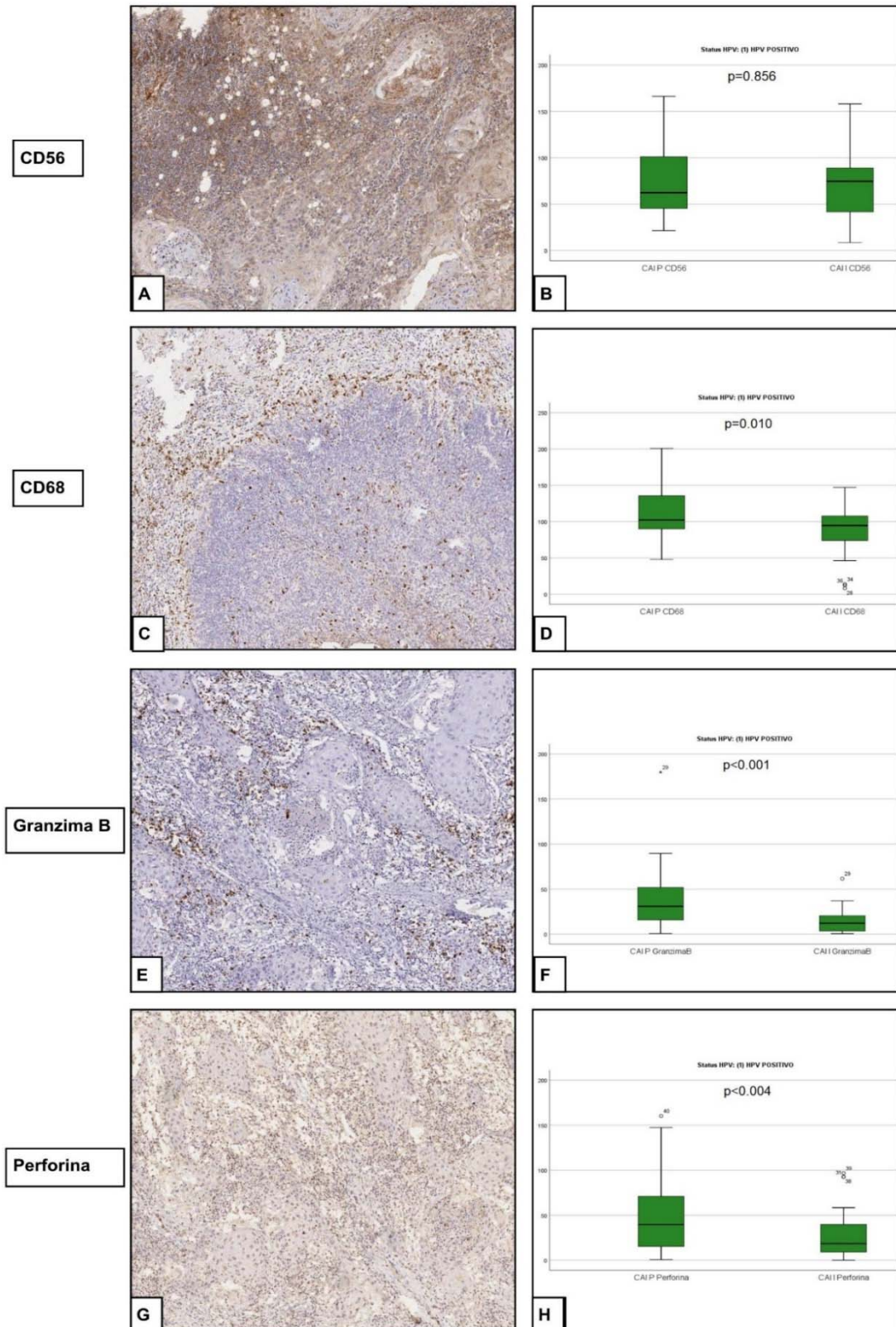


Figura 8 - Marcação imunohistoquímica de CD56, CD68, Granzima B e Perforina e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV positivos. (A) marcação peri e intratumoral de CD56; (B) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de CD56; (C) marcação peri e intratumoral de CD68; (D) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de CD68; (E) marcação peri e intratumoral de granzima B; (F) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de Granzima B; (G) marcação peri e intratumoral de perforina; (H) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de Perforina. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

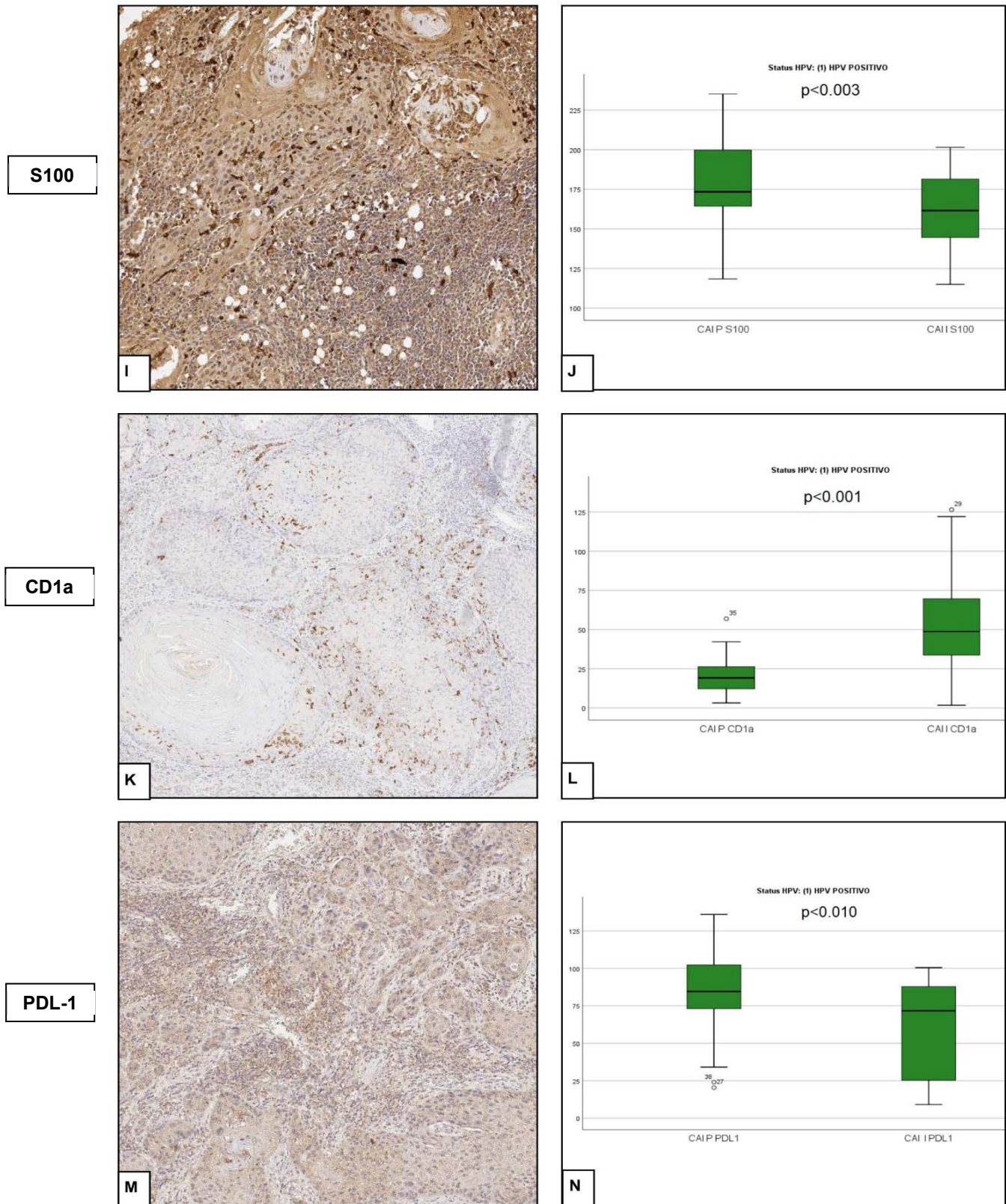


Figura 9 - Marcação imunohistoquímica S100, CD1a e PD-L1 e a diferença entre as expressões nas regiões peri e intratumoral dos casos HPV positivos. (I) marcação peri e intratumoral de S100; (J) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de S100; (K) marcação peri e intratumoral de CD1a; (L) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de CD1a; (M) marcação peri e intratumoral de PD-L1; (N) diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral de PD-L1. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

A **Tabela 8** apresenta a relação entre os marcadores de células inflamatórias nas diferentes regiões e as características clínico-patológicas das pacientes para o CEC do tipo HPV *independente*. Os resultados obtidos demonstram que a expressão moderada/forte de S100 parece ter grande relevância clínica. Na região peritumoral, S100 apresentou associação positiva estatisticamente significativa com metástase linfonodal ($p=0,008$). Já a expressão na região intratumoral revelou associações estatisticamente significativas com invasão perineural ($p=0,007$) e metástase linfonodal ($p=0,043$), além de tender a associar-se com o estadiamento FIGO ($p=0,055$). As demais características não apresentaram associações estatísticas significativas.

As associações entre as expressões dos marcadores nas diferentes regiões e as características clínico-patológicas em CEC HPV *associado* estão evidenciadas na **Tabela 9**. Foram observadas associações estatisticamente significativas entre as expressões moderada/forte de perforina relacionada a menor profundidade de invasão nas regiões peritumoral ($p=0,013$) e intratumoral ($p=0,022$). A expressão de CD1a na região peritumoral apresentou tendência associar-se com ausência de invasão vascular + perineural ($p=0,059$). A expressão aumentada de PD-L1 na região intratumoral apresentou uma tendência a associar-se com a ausência de invasão perineural ($p=0,056$) nesse tipo tumoral.

Tabela 8 - Associações entre as expressões moderada/forte dos marcadores CD56, CD68, Granzima B, Perforina, S100 e CD1a e os dados clínico-patológicos no carcinoma vulvar HPV independente (CEC HPV independente)

HPV -	Variáveis	Categoria	Peritumoral		Intratumoral	
			Mediana	p	Mediana	p
CD56	Profundidade de Invasão	DS e DM	99,5	0,832	72,5	0,376
		DP e Dsub	114,8		108,1	
	Invasão Vascular	Não	98,6	0,324	69,3	0,067
		Sim	129,7		126,9	
	Invasão Perineural	Não	99,5	0,712	78,7	0,902
		Sim	104,8		80,1	
	Invasão V+P	Não	88,5	0,721	71,3	0,415
		Sim	128,8		104,8	
	Metástase Linfonodal	Não	99,5	0,662	91,9	1,000
		Sim	79,8		86,3	
Estadiamento FIGO	I, II	100,5	0,446	75,7	0,558	
	III e IV	78,5		81,7		
CD68	Profundidade de Invasão	DS e DM	88,3	0,148	75,9	0,343
		DP e Dsub	118,1		79,3	
	Invasão Vascular	Não	94,0	0,505	78,2	0,456
		Sim	117,4		84,3	
	Invasão Perineural	Não	112,2	0,386	85,1	0,166
		Sim	88,1		67,1	
	Invasão V+P	Não	111,9	0,494	81,1	0,871
		Sim	113,5		73,5	
	Metástase Linfonodal	Não	125,9	0,081	91,2	0,573
		Sim	97,7		78,5	
Estadiamento FIGO	I, II	116,7	0,640	79,3	0,815	
	III e IV	109,7		73,6		
Granzima B	Profundidade de Invasão	DS e DM	19,3	1,000	5,2	0,693
		DP e Dsub	16,4		3,8	
	Invasão Vascular	Não	16,4	0,188	3,8	0,409
		Sim	30,4		11,3	
	Invasão Perineural	Não	21,0	0,902	4,17	0,484
		Sim	16,3		10,5	
	Invasão V+P	Não	17,0	0,494	3,64	0,310
		Sim	21,2		10,7	
	Metástase Linfonodal	Não	14,7	0,755	4,63	0,282
		Sim	28,6		18,5	
Estadiamento FIGO	I, II	17,8	0,953	7,08	0,682	
	III e IV	17,7		3,48		
Perforina	Profundidade de Invasão	DS e DM	84,4	0,784	67,0	0,879
		DP e Dsub	110,5		72,8	
	Invasão Vascular	Não	88,0	0,667	72,8	0,845
		Sim	115,0		65,6	
	Invasão Perineural	Não	92,5	0,538	76,8	0,4844
		Sim	76,1		28,8	
	Invasão V+P	Não	84,4	0,820	63,1	0,721
		Sim	115,0		65,6	
	Metástase Linfonodal	Não	131,4	0,142	77,0	0,282
		Sim	57,1		38,2	
Estadiamento FIGO	I, II	97,0	0,682	81,2	0,379	
	III e IV	69,7		44,6		

Cont/Tabela 8

HPV -	Variáveis	Categoria	Peritumoral		Intratumoral	
			Mediana	p	Mediana	p
S100	Profundidade de Invasão	DS e DM	156,0	0,693	151,8	0,832
		DP e Dsub	176,1		163,0	
	Invasão Vascular	Não	171,6	0,324	156,7	0,611
		Sim	160,8		136,9	
	Invasão Perineural	Não	173,9	0,342	159,8	0,007*
		Sim	149,4		128,7	
	Invasão V+P	Não	168,6	0,626	159,8	0,177
		Sim	164,7		131,9	
	Metástase Linfonodal	Não	192,0	0,008*	166,9	0,043*
		Sim	149,4		136,9	
Estadiamento FIGO	I, II	177,6	0,194	163,8	0,055*	
	III e IV	153,3		133,0		
CD1a	Profundidade de Invasão	DS e DM	32,6	0,232	61,8	0,832
		DP e Dsub	20,8		59,8	
	Invasão Vascular	Não	28,2	0,218	59,3	0,286
		Sim	16,9		91,0	
	Invasão Perineural	Não	22,0	0,594	66,9	0,434
		Sim	27,7		88,1	
	Invasão V+P	Não	25,2	0,770	59,5	0,199
		Sim	23,1		91,0	
	Metástase Linfonodal	Não	29,9	0,755	56,7	0,108
		Sim	31,5		114,5	
Estadiamento FIGO	I, II	28,8	0,155	69,6	0,446	
	III e IV	20,8		59,6		
PDL 1	Profundidade de Invasão	DS e DM	83,6	0,313	42,9	0,186
		DP e Dsub	93,7		69,6	
	Invasão Vascular	Não	88,5	0,667	58,3	0,162
		Sim	95,1		75,4	
	Invasão Perineural	Não	86,5	0,594	53,2	0,386
		Sim	95,5		68,7	
	Invasão V+P	Não	86,5	1,000	53,2	0,177
		Sim	94,1		75,4	
	Metástase Linfonodal	Não	79,5	1,000	48,0	0,108
		Sim	84,1		94,9	
Estadiamento FIGO	I, II	80,2	0,411	58,3	0,815	
	III e IV	94,5		66,7		

Legendas: V+P: vascular + perineural; DS: derme superficial; DM: derme média; DP: derme profunda; Dsub: derme subcutânea. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

Tabela 9 - Associações entre as expressões moderada/forte dos marcadores CD56, CD68, Granzima B, Perforina, S100 e CD1a e os dados clínico-patológicos no carcinoma vulvar *HPV associado* (CEC *HPV associado*)

HPV +	Variáveis	Categoria	Peritumoral		Intratumoral	
			Mediana	p	Mediana	p
CD56	Profundidade de Invasão	DS e DM	45.4	0,243	69.0	0,447
		DP e Dsub	63.8		80.3	
	Invasão Vascular	Não	47.1	0,296	74.7	0,956
		Sim	66.0		54.2	
	Invasão Perineural	Não	47.8	0,360	74.7	0,498
		Sim	65.7		113.1	
	Invasão V+P	Não	47.1	0,246	74.7	0,775
		Sim	65.7		80.3	
	Metástase Linfonodal	Não	55.5	1,000	67.1	1,000
		Sim	64.9		52.2	
Estadiamento FIGO	I, II	55.1	0,762	67.1	0,762	
	III e IV	56.1		74.9		
CD68	Profundidade de Invasão	DS e DM	102.6	0,497	100.9	0,079
		DP e Dsub	100.4		82.6	
	Invasão Vascular	Não	103.1	0,202	97.0	0,549
		Sim	90.0		92.2	
	Invasão Perineural	Não	102.1	0,738	94.5	0,738
		Sim	135.6		101.8	
	Invasão V+P	Não	103.1	0,387	97.0	0,443
		Sim	90.3		87.8	
	Metástase Linfonodal	Não	116.4	0,762	61.5	0,171
		Sim	90.0		98.2	
Estadiamento FIGO	I, II	115.0	0,633	82.3	0,360	
	III e IV	97.4		98.2		
Granzima B	Profundidade de Invasão	DS e DM	33.8	0,278	15.8	0,095
		DP e Dsub	27.9		4.8	
	Invasão Vascular	Não	14.2	0,163	13.0	0,703
		Sim	14.2		9.9	
	Invasão Perineural	Não	30.9	1,000	13.0	0,654
		Sim	35.0		7.4	
	Invasão V+P	Não	33.4	0,289	13.0	0,566
		Sim	24.6		7.4	
	Metástase Linfonodal	Não	28.1	0,762	20.8	0,762
		Sim	29.4		17.0	
Estadiamento FIGO	I, II	51.8	0,068	6.1	0,573	
	III e IV	21.1		14.9		
Perforina	Profundidade de Invasão	DS e DM	70.9	0,013*	38.7	0,022*
		DP e Dsub	19.3		10.4	
	Invasão Vascular	Não	57.7	0,245	38.6	0,245
		Sim	19.3		11.0	
	Invasão Perineural	Não	39.5	0,912	18.5	0,824
		Sim	46.9		21.1	
	Invasão V+P	Não	57.7	0,289	38.6	0,289
		Sim	20.8		11.6	
	Metástase Linfonodal	Não	34.7	0,762	29.6	0,762
		Sim	34.7		16.3	
Estadiamento FIGO	I, II	28.1	0,515	13.2	0,360	
	III e IV	54.7		29.8		

Cont/Tabela 9

HPV +	Variáveis	Categoria	Peritumoral		Intratumoral	
			Mediana	p	Mediana	p
S100	Profundidade de Invasão	DS e DM	185.2	0,497	168.0	0,549
		DP e Dsub	167.4		159.3	
	Invasão Vascular	a	174.0	0,785	161.6	0,350
		Sim	169.3		172.5	
	Invasão Perineural	Não	174.0	0,250	161.6	0,824
		Sim	163.5		157.4	
	Invasão V+P	Não	174.0	0,503	161.6	0,703
		Sim	165.2		159.3	
	Metástase Linfonodal	Não	183.1	0,762	162.9	0,352
		Sim	175.7		175.6	
	Estadiamento FIGO	I, II	170.7	0,965	159.3	0,101
		III e IV	172.8		174.2	
CD1a	Profundidade de Invasão	DS e DM	23.8	0,211	58.8	0,113
		DP e Dsub	14.9		39.1	
	Invasão Vascular	Não	22.2	0,102	58.7	0,202
		Sim	12.8		31.4	
	Invasão Perineural	Não	19.2	0,360	56.9	0,912
		Sim	10.6		39.1	
	Invasão V+P	Não	22.2	0,059*	58.7	0,117
		Sim	10.6		38.4	
	Metástase Linfonodal	Não	19.7	0,762	44.1	0,914
		Sim	15.0		39.4	
	Estadiamento FIGO	I, II	17.1	0,762	44.1	0,762
		III e IV	19.3		48.6	
PDL 1	Profundidade de Invasão	DS e DM	84.7	0,549	48.6	0,356
		DP e Dsub	84.6		73.1	
	Invasão Vascular	Não	86.9	0,412	71.7	0,477
		Sim	77.7		71.0	
	Invasão Perineural	Não	86.9	0,056*	71.7	0,912
		Sim	70.8		42.7	
	Invasão V+P	Não	86.9	0,289	71.7	0,566
		Sim	75.4		57.4	
	Metástase Linfonodal	Não	84.9	0,610	56.2	0,610
		Sim	85.6		85.6	
	Estadiamento FIGO	I, II	83.7	0,829	64.6	0,596
		III e IV	91.3		85.6	

Legendas: V+P: vascular + perineural; DS: derme superficial; DM: derme média; DP: derme profunda; Dsub: derme subcutânea. * Estatisticamente significativo, $p < 0,05$.

As funções de sobrevida global e sobrevida livre de doença relacionadas aos fatores clínico-patológicos estão apresentadas na **Tabela 10** para o CEC HPV *independente* e HPV *associado*. Conforme disposto na tabela e da curva de sobrevida demonstrada na **Figura 10** é possível notar que pacientes que tiveram invasão do espaço vascular, apresentaram pior sobrevida global ($p=0,025$) quando comparado àquelas que não manifestaram essa característica em CEC HPV *independente*.

Além disso, a ocorrência de invasão vascular + perineural também demonstrou ser indicador negativo de sobrevida livre de doença ($p=0,045$) em CEC HPV *independente*, segundo a **Tabela 10** e a curva de sobrevida evidenciada na **Figura 11**.

Tabela 10 - Sobrevida global e livre de doença relacionadas com as características clínico-patológicas de CEC HPV *independente* e HPV *associado*

	<i>CEC HPV independente (n=25)</i>		<i>CEC HPV associado (n=19)</i>	
	Sobrevida global (<i>p</i>)	Sobrevida livre de doença (<i>p</i>)	Sobrevida global (<i>p</i>)	Sobrevida livre de doença (<i>p</i>)
Tabagismo	0,596	0,542	0,680	0,859
Profundidade de invasão	0,628	0,785	0,769	0,446
Invasão vascular	0,025*	0,146	0,805	0,124
Invasão perineural	0,733	0,786	0,369	0,141
Invasão V+P	0,152	0,045*	0,677	0,179
Metástase linfonodal	0,067	0,812	0,461	0,747
Estadiamento FIGO	0,851	0,261	0,883	0,479

Legendas: Invasão V+P: vascular + perineural; DS: derme superficial; DM: derme média; DP: derme profunda; Dsub: derme subcutânea. * Estatisticamente significativo, $p<0,05$.

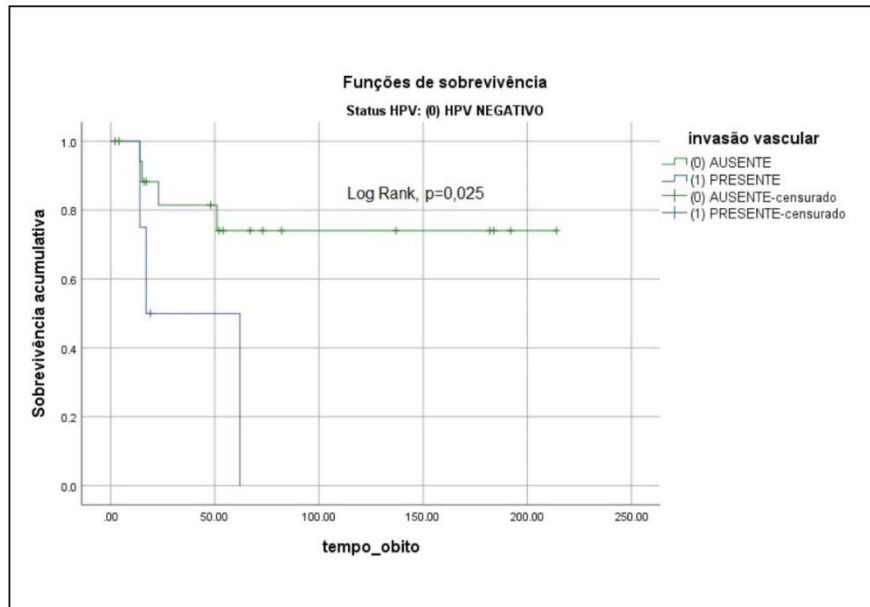


Figura 10 - Curva de sobrevida global associada à invasão vascular em CEC vulvar HPV *independente*. Estatisticamente significativo: $p<0,05$.

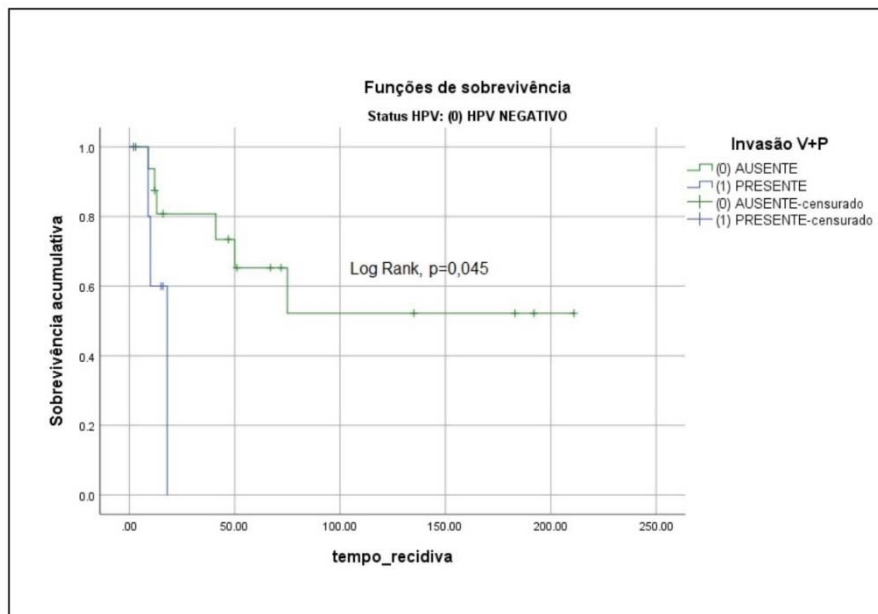


Figura 11 - Curva de sobrevida livre de doença associada à invasão vascular + perineural em CEC vulvar HPV *independente*. Estatisticamente significativo: $p<0,05$.

As associações obtidas entre as expressões moderada/intensa dos marcadores inflamatórios nas regiões peri e intratumoral e as sobrevidas global e livre de doença constam na **Tabela 11**. De início, já é possível constatar que CD1a desempenha um papel importante nas funções de sobrevivência, uma vez que aparece relacionado em todos os casos de CEC HPV *independente* e HPV *associado*. Em se tratando primeiramente de sobrevida global, em CEC HPV *independente* temos que sua alta expressão nessa região intratumoral é preditivo de menor sobrevida global ($p=0,059$) (**Figura 12**). De modo semelhante, a expressão alta de CD1a intratumoral também apresentou menor índice de sobrevida global em CEC HPV *associado*, conforme mostrado na **Figura 13A** ($p=0,059$). Por fim, uma melhor taxa de sobrevida global parece estar relacionada baixa expressão de CD56 na região intratumoral de CEC HPV *associado* ($p=0,043$) quando comparado a expressão moderada/forte desse marcador (**Figura 13B**).

Para as sobrevidas livres de doença (recidiva), nossos resultados demonstraram que a expressão moderada/intensa de CD1a na região peritumoral denota melhor sobrevida livre de recidiva em CEC HPV *independente* ($p=0,045$) (**Figura 14**). Similarmente, observamos que o mesmo ocorre no CEC HPV *associado*, sinalizando que a expressão moderada/intensa de CD1a na região peritumoral também está relacionada como melhor taxa de sobrevida livre de doença ($p=0,008$) (**Figura 15A**). A **Figura 15B** evidencia que a expressão moderada/intensa de S100 apresenta melhores taxas de sobrevida livre de recidiva quando presente na região intratumoral de CEC HPV *associado* ($p=0,057$). Por fim, a expressão moderada/intensa de PDL-1 na região intratumoral de CEC HPV *associado* é indicativo de melhor sobrevida livre de doença ($p=0,021$) (**Figura 15C**).

Tabela 11 - Associação entre as sobrevidas global e livre de doença (recidiva) e a expressão moderada/forte dos marcadores de células inflamatórias nas regiões peri e intratumoral no CEC de vulva HPV independente e *HPV associado*

		HPV negativo (n=25)		HPV positivo (n=19)	
		Sobrevida global (p)	Sobrevida livre de doença (p)	Sobrevida global (p)	Sobrevida livre de doença (p)
CD56	Peritumoral	0,189	0,102	0,043*	0,570
	Intratumoral	0,227	0,064	0,117	0,835
CD68	Peritumoral	0,876	0,356	0,890	0,778
	Intratumoral	0,893	0,822	0,076	0,489
Granzima B	Peritumoral	0,710	0,969	0,441	0,420
	Intratumoral	0,559	0,103	0,591	0,663
Perforina	Peritumoral	0,523	0,130	0,677	0,774
	Intratumoral	0,906	0,320	0,287	0,470
S100	Peritumoral	0,499	0,210	0,935	0,188
	Intratumoral	0,523	0,864	0,987	0,057*
CD1a	Peritumoral	0,495	0,045*	0,895	0,008*
	Intratumoral	0,059*	0,383	0,057*	0,416
PD-L1	Peritumoral	0,993	0,758	0,937	0,021*
	Intratumoral	0,208	0,267	0,361	0,563

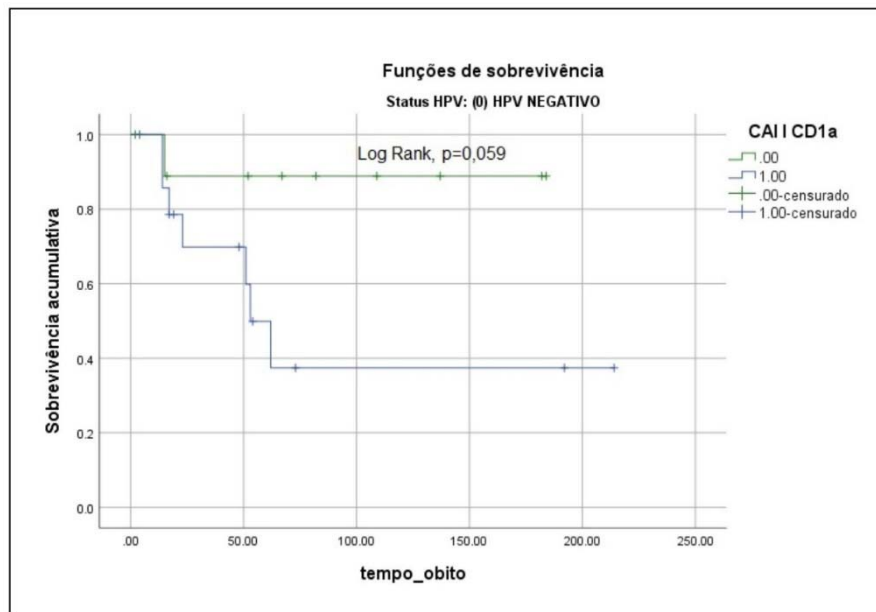


Figura 12 - Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador CD1a na região intratumoral (CAI I) em CEC vulvar HPV independente. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

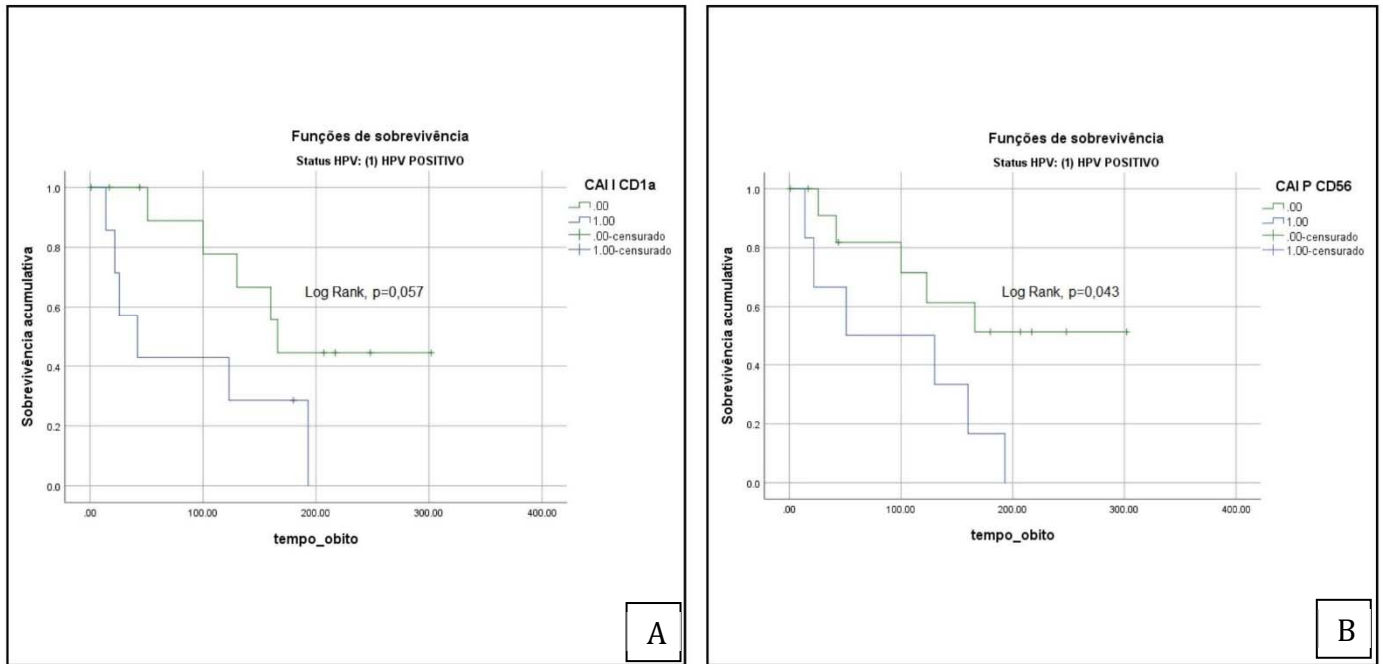


Figura 13 - (A) Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador CD1a na região intratumoral (CAI I) em CEC vulvar *HPV associado*. (B) Curva de sobrevida global associada à expressão do marcador CD56 na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar *HPV associado*. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

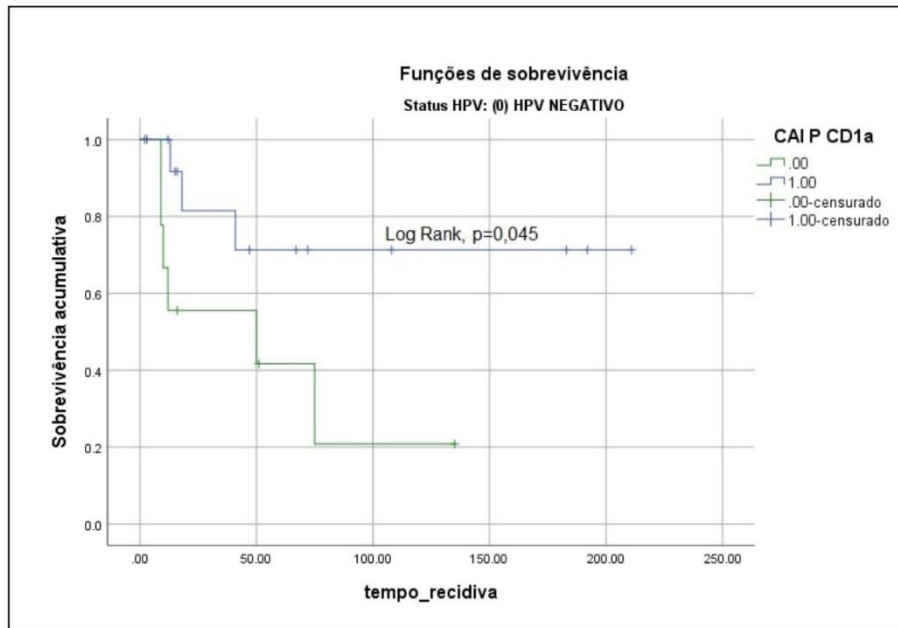


Figura 14 - Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador CD1a na região peritumoral (CAIP) em CEC vulvar HPV *independente*. Estatisticamente significativo: $p < 0,05$.

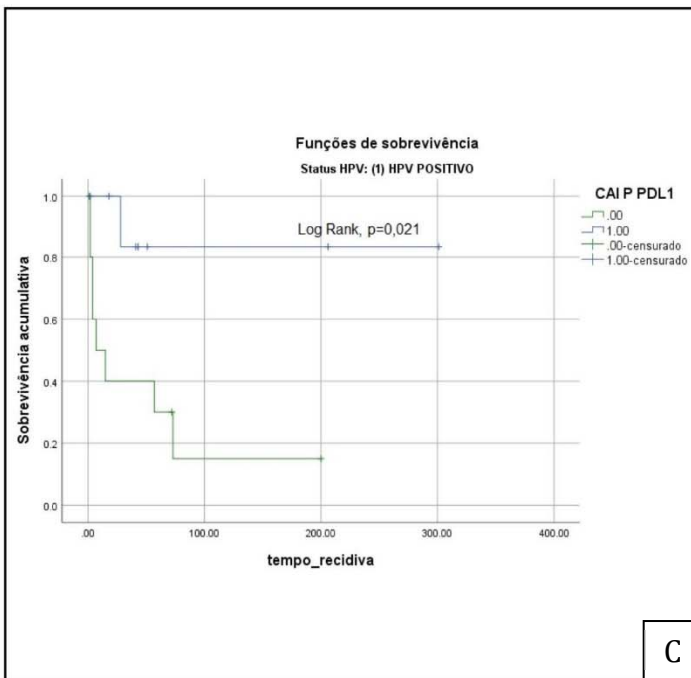
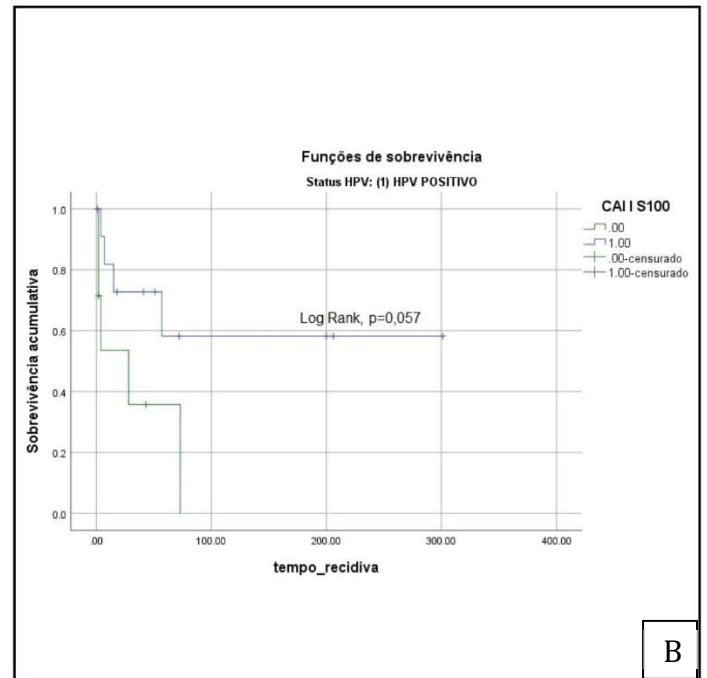
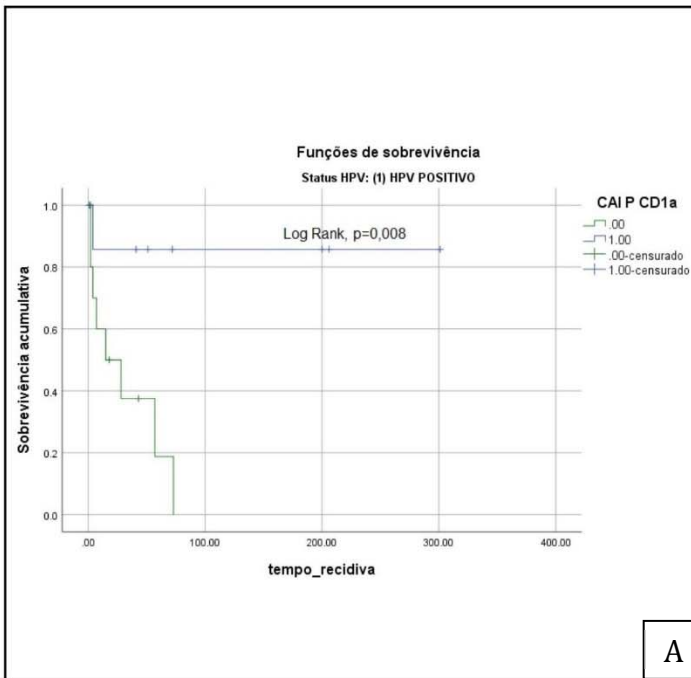


Figura 15 - (A) Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador CD1a na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar HPV *independente*; **(B)** Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador S100 na região intratumoral (CAI I) em CEC vulvar HPV *associado*; **(C)** Curva de sobrevida livre de doença associada à expressão do marcador PD-L1 na região peritumoral (CAI P) em CEC vulvar HPV *associado*. Estatisticamente significativo: $p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

De acordo com consenso, a idade média para o desenvolvimento do carcinoma vulvar das vias CEC do tipo HPV *independente* está entre os 55 a 85 anos ¹²⁶. Os resultados do nosso grupo de pesquisa demonstraram nessa coorte, uma mediana etária correspondente a sétima década de vida, em consonância com os demais estudos ³⁵.

No CEC do tipo HPV *associado*, é relatada na literatura uma média de idade ao acometimento que varia entre 35 a 65 anos ¹²⁶; embora a nossa casuística seja limitada pelo número de pacientes, totalizando 19 pacientes nessa coorte, assim é possível notar o predomínio de mulheres jovens, se comparado à outra coorte, o que vai de encontro com o padrão estabelecido para essa via ^{127,128}.

Apesar da nossa casuísta contemplar o maior número de casos na via de CEC HPV *independente*, que tem como característica mulheres mais velhas, observamos que esses casos são de pacientes com diagnósticos antigos em nossa instituição. Já a via de CEC HPV *associado*, não obstante termos 19 casos, esses compõem diagnósticos mais recentes, o que pode corroborar com a hipótese do crescimento de casos de carcinoma vulvar em mulheres jovens, devido ao aumento do número de infecções por HPV ¹²⁹.

Em outros tipos de carcinoma, a faixa etária mais jovem é reconhecidamente o de pior prognóstico, a exemplo do carcinoma de mama ¹³⁰. Em oposição a essa neoplasia, no carcinoma vulvar HPV *independente* são as mulheres mais velhas que apresentam o pior prognóstico. Isso deve-se ao fato da via que acomete idades mais avançadas apresentarem associações com fatores que agravam o curso da doença, como mutações do gene p53, inefetividade de ação do sistema imunológico, doenças associadas como líquen escleroso, além de fatores genéticos e processos inflamatórios crônicos ^{41,131,132}.

A idade, nesse caso, está intrinsecamente relacionada a um fator muito importante, o qual de fato é considerado indicador de prognóstico e um dos mais importantes em neoplasias do trato anogenital: a crescente taxa de infecção por HPV. De todas as mulheres expostas ao vírus, apenas uma pequena fração evoluirá para uma infecção persistente e a maioria dos que progridem apresentam genótipo de alto risco ^{133,134}.

Entre as variantes de alto risco, que detém maior capacidade de evoluir para câncer, estão HPVs 16 e o 18, responsáveis por aproximadamente 70% das neoplasias cervicais invasivas de todo o mundo ¹³⁵. Em nossa coorte foi observada que aproximadamente 84% dos 19 casos estiveram relacionados aos genótipos de alto risco, sendo os três subtipos mais

frequentes o 16, 18 e 33. Em uma revisão sistemática e meta-análise realizada por Faber et al.¹⁴ para o CEC de vulva, os autores estimaram a prevalência do DNA do HPV e sua distribuição de acordo com os genótipos mais frequentes. Nesse estudo, eles relataram que a prevalência de HPV observada em carcinoma vulvar é cerca de 40%. Além disso, eles identificaram como subtipo predominante o HPV 16 (76,5%), seguidos pelos subtipos 33 (9,0%) e 18 (5,4%), sendo esses resultados semelhantes aos de meta-análises publicados anteriormente e análogo aos nossos achados.

Quanto as outras neoplasias, como o câncer de colo do útero, áreas anogenitais e orofaríngeas femininas e masculinas são usualmente motivadas pela presença de HPV dos tipos 16 e 18¹³⁶, evidenciando o papel significativo da infecção por HPV em diversas doenças benignas e malignas.

As neoplasias que apresentam relação com o HPV constituem uma entidade completamente distinta daquelas que não estão associadas a ele e, em diversos casos, essa associação está relacionada a um prognóstico favorável¹³⁴, como carcinoma de cabeça e pescoço¹³⁷, orofaríngeal¹³⁸ e cervical¹³⁹.

O fator que tem ampliado a crença da atribuição dessa associação a um importante marcador de prognóstico de sobrevida é a heterogeneidade que esses tumores exibem. Estudos constataram que em outras patologias malignas relacionadas ao HPV, essa associação pode resultar em melhora da sobrevida¹³⁹.

Os estudos descritos quanto a associação do HPV aos melhores prognósticos de sobrevida estão os tumores orofaríngeos, com melhora da sobrevida global em 3 anos nos pacientes que foram submetidos a terapia de quimiorradiação¹⁴⁰. De modo similar, no carcinoma anal a positividade para HPV está relacionada com a melhor sobrevida global¹⁴¹.

No carcinoma peniano associado ao HPV de alto risco estiveram associados a melhor sobrevida câncer específica de cinco anos para 96% dos pacientes, em comparação a 82% para os casos HPV negativo. Além disso, nesse último caso uma análise multivariada indicou o status do HPV do tumor como um preditor independente de sobrevida^{142,143}.

Em carcinoma vulvar, a infecção por HPV é sabidamente reconhecida como preditor independente de melhor sobrevida¹⁴⁴. Diversos mecanismos podem explicar essa associação de neoplasias HPV positivas com melhor prognóstico, uma vez que o status do tumor pode determinar o perfil molecular do câncer, com influência direta na resposta à terapia. Isso porque os tumores associados ao HPV exibem maior sensibilidade à radioterapia, relatado também para neoplasias de cabeça e pescoço^{140,145}. Os fatores

biológicos distintos podem estar envolvidos na melhor resposta à radioterapia, dentre eles, o aumento da resposta imune mediada pelo agente viral ^{144,145}.

Alguns autores sugerem que as vias dependente e independente de HPV podem distinguir quanto ao tipo de infiltrado de células imunológicas e essa característica tende a acarretar diversos significados prognósticos. Dessa forma, a vigilância imune local e as respostas imunológicas que implicam no curso clínico dependem do status do HPV, que podem alterar o microambiente tumoral e implicar em melhor ou pior prognóstico ¹⁴⁶.

Assim, o reconhecimento da identidade exata e das características funcionais dos infiltrados inflamatórios relacionados ao tumor é cada vez mais reconhecida ¹⁴⁷.

O sistema imune apresenta diversos papéis, sendo em sua grande maioria complexos e contraditórios ao longo da progressão tumoral ¹⁴⁷. Há uma interação entre as células imunológicas com os tumores ao longo do processo de desenvolvimento neoplásico e da progressão para a metástase. Esse cruzamento complexo entre o sistema imune e as células tumorais podem inibir e favorecer o crescimento tumoral e hoje é reconhecida como uma “marca registrada do câncer” (do inglês, “*Hallmark of cancer*”) ¹⁴⁸.

A relação entre a inflamação crônica e o aumento da progressão neoplásica ¹⁴⁷ envolve que a resposta imunológica do hospedeiro, associada as transformações malignas, desempenhe um importante papel no desfecho clínico da doença. Nesse sentido, o estado imunológico pode contribuir para o desenvolvimento neoplásico, estando associando aos fenótipos mais agressivos ^{149,150}.

A evidência mais clara de que o microambiente imunológico desregulado influencia a tumorigênese é o contexto de inflamações crônicas, o qual há uma alta incidência de transformação tumoral. O início da transformação surge a partir de respostas inflamatórias mal sucedidas, em que diversas células do estroma se acumulam e perdem a função de homeostase, resultando em um ambiente pró-tumorigênico ¹⁵¹. Além disso, em um estudo de meta-análise os autores relataram que aproximadamente 15% das neoplasias foram iniciadas a partir de infecções por agentes etiológicos como vírus, bactérias e parasitas. Essas infecções desencadearam inflamações crônicas que resultaram na transformação tumoral, apoiando a teoria da conexão entre infecções, inflamações e transformação neoplásica ¹⁵².

Durante o desenvolvimento tumoral, o microambiente inflamatório crônico reduz a resposta imunológica antitumoral, favorecendo o escape das células transformadas da eliminação pelo sistema imune ¹⁵³⁻¹⁵⁵. Os mesmos mecanismos usados para escape imunológico em doenças malignas humanas podem explicar discrepâncias entre falhas e

sucessos na imunoterapia ¹⁵⁶.

A relação causal entre o processo inflamatório, a imunidade inata e adquirida e diferentes tipos de câncer é vastamente demonstrada na literatura e apresenta um importante papel na imunovigilância ¹⁵⁷. Além disso, é sabido que o microambiente composto por células imunes inatas locais é capaz de influenciar respostas imunes inatas e desencadear o processo de resposta adaptativas em neoplasias ¹⁵⁸.

A variedade de células imunitárias que se infiltram em células cancerosas durante um evento neoplásico é altamente heterogênea, variando não somente entre os tipos tumorais, como também quanto a sua localização em relação as células transformadas, ainda que nos mesmos tipos tumorais ¹⁵⁹. A localização do infiltrado inflamatório, que pode estar disposto ao redor das células neoplásicas (peritumoral) ou dentro delas (intratumoral) é considerado um fator de extrema importância, uma vez que tem o potencial de determinar a agressividade e o curso da doença ¹⁶⁰.

Dessa forma, além da composição celular, a localização, a arquitetura, a articulação funcional do infiltrado inflamatório e o contexto imunológico devem ser analisados a fim de compreender seu significado. Assim, essas células podem contribuir através do desenvolvimento de biomarcadores preditivos ou prognósticos precisos para otimizar o benefício do paciente, minimizar o risco de toxicidades e orientar as abordagens de combinação ^{161,162}.

O mecanismo de evasão imunológica acidentalmente se tornou uma oportunidade para novas estratégias terapêuticas contra o câncer, utilizando as células imunes para tratamento dessa condição. Como demonstrado por Hodi et al. ¹⁶³, Robert et al. ¹⁶⁴ e Gibney et al. ¹⁶⁵, Ipilimumabe foi o primeiro anticorpo imunológico que utilizou inibidor de pontos de controle imunológico, conhecido como “*imuno-checkpoint*”, para tratamento de pacientes com melanoma. Essa droga tem como principal alvo o linfócito citotóxico antígeno-4 (CTLA-4), que atua impedindo a inibição de células T e promovendo a ativação e proliferação de efetores células T. Desde então, diversos ensaios clínicos estão sendo realizados em todo o mundo visando analisar a eficácia de outros inibidores de imuno-checkpoints para monoterapia ou combinado com outras terapias ¹⁶⁶.

Outros tipos de inibidores, como por exemplo PD-1 apresentaram resultados promissores em melanoma e carcinoma pulmonar não pequenas células ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Pacientes com carcinoma de mama triplo negativo apresentam resposta moderada a PD-1 ¹⁷⁰. Um aumento de 13 a 24% na taxa de resposta geral foi observado no carcinoma de bexiga urotelial tratados com inibidores de PD-1 / PD-L1 ¹⁷¹.

Dada a importância das células imunológicas e sua localização na resposta antitumoral, no presente trabalho um dos nossos objetivos foi identificar as expressões das células imunes das duas regiões de interesse: peri e intratumoral.

Os resultados obtidos da análise dos marcadores de células inflamatórias CD68, Granzima B, Perforina, S100 e PD-L1 a partir da imunohistoquímica, apontaram a maior concentração de infiltrado de células esteve presente na região peritumoral, tanto para CEC HPV associado, quanto para independente. Para a população de CD56 de CEC HPV independente observamos o mesmo padrão de expressão apresentado pelas demais células. No entanto, as CEC HPV associado, apresentaram maior concentração de infiltrado de CD56 na região intratumoral.

A outra exceção quanto ao local de concentração das células imunes foi CD1a, que apresentou o padrão contrário às demais marcações para os dois subtipos estudados: a maior expressão foi observada na região intratumoral para o subtipo HPV associado e independente.

A infiltração de células dendríticas imaturas CD1a reflete o mecanismo de defesa do hospedeiro e está associado com melhor prognóstico, redução de recorrência tumoral e diminuição de metástase¹⁷²⁻¹⁷⁴. Essa condição é observada em diversas neoplasias como de mama¹⁷⁵, gástrico¹⁷⁶, pancreático¹⁷⁷, laríngeal¹⁷⁸ e carcinoma papilar de tireoide¹⁷⁹.

Para esses tumores, a infiltração densa por CD1a é correlacionada com um prognóstico favorável, sugerindo que essas células desempenhem um papel mediado por células T em respostas antitumorais¹⁷⁹.

No entanto, Nguyen et al.¹⁸⁰ demonstraram que o número de CD1a encontra-se reduzido no estroma de pacientes mais jovens com câncer orofaríngeo dependente de HPV, sugerindo uma modulação do microambiente tumoral induzida pelo vírus. Em 2007, os autores reportaram que em CEC de vulva já era postulado a redução no número de CD1a, o qual atribuíram como uma das causas para a maior tendência a carcinogênese vulvar¹⁸¹.

Ou seja, a infecção persistente pelo HPV induz a imunossupressão do microambiente tumoral induzindo a carcinogênese a partir da redução na concentração de CD1a e de outras células inflamatórias em lesões precursoras de vulva⁴⁸.

Nossos resultados mostraram que não houve discrepância considerável quanto a expressão das células inflamatórias entre dois subtipos de CEC. No entanto, a expressão de perforina apresentou diferença estatística significativa em relação a mediana de seus valores, com maior expressão em CEC HPV negativo tanto na região peritumoral ($p=0,004$), quanto intratumoral ($p=0,021$).

Sabe-se que a perforina é parte constituinte das células NK, que desempenham um papel na resposta imune inata antiviral. Uma vez que as células NK expressam a perforina com as demais partes constitutivas (interferon, granzima e perforina) formam um complexo para iniciar a resposta imune antiviral ¹⁴⁶.

Todavia, é sabido que o HPV evoluiu mecanismos de evasão, o qual interfere na resposta adaptativa, permitindo que o vírus persista e progrida para uma neoplasia ^{182,183}. Os pesquisadores Sheu et al. ¹⁸⁵ demonstraram que a regulação negativa de perforina no carcinoma cervical parece ser uma possível via de escape imunológico, o que pode explicar a diferença de expressão significativa entre CEC *HPV associado* e independente em nosso estudo, mediada pela ação viral para evadir à resposta imune.

Além disso, Sznurkowski et al. ¹⁸⁶ reportou que embora a imunidade inata represente a primeira linha de defesa ao patógeno, grande parte das células tumorais humanas são resistentes à lise mediada por perforina, sendo raramente encontrados infiltrados linfocitários tumorais em carcinomas avançados.

No carcinoma pulmonar não pequenas células, por exemplo, a expressão de perforina foi significativamente diminuída em pacientes com menor tempo de sobrevida. Em outras palavras, a expressão elevada de perforina mostrou ter uma correlação positiva com a sobrevida de pacientes com carcinoma pulmonar avançado ¹⁸⁷.

As expressões das células inflamatórias para o HPV *independente* estão dispostas em figuras, evidenciando o padrão observado nas marcações obtidas por imunohistoquímica.

Nessas figuras é possível notar que a maior concentração de células imunes está ao redor das células tumorais. O espaço intratumoral apresenta pouca quantidade de infiltrado e, em alguns casos, com intensidade fraca. Em todos os marcadores, exceto em CD56 *HPV associado*, a diferença de expressão entre as regiões peri e intratumoral apresentaram significância estatística (**HPV independente**: CD56 $p=0,061$; CD68 $p=0,001$; granzima B $p=0,002$; perforina $p=0,000$; S100 $p=0,001$; CD1a $p=0,000$ e PD-L1 $p=0,005$; **HPV associado**: CD56 $p=0,856$; CD68 $p=0,010$; granzima B $p=0,001$; perforina $p=0,004$; S100 $p=0,003$; CD1a $p=0,001$ e PD-L1 $p=0,010$).

Por se tratar de um assunto vastamente explorado, ainda não há um consenso acerca do papel das células imunes na evolução do câncer nas distintas localizações e tipos tumorais; todavia, nossos resultados sugerem que a imunovigilância na região peritumoral tende a impedir a progressão da doença.

A presença das células imunológicas nas regiões peri e intratumoral estão associadas

favoravelmente às características clínico-patológicas, bem como com melhor sobrevida nas pacientes acometidas com a neoplasia.

De acordo com Jochems e Schlom ¹⁸⁸, a localização do infiltrado de células imunológicas é considerado um fator de grande relevância, uma vez que o microambiente tumoral, ao atuar em diferentes localizações e esse fator pode influenciar o sistema imunológico a desempenhar seu papel na imunidade antitumoral ou na progressão da doença.

Os marcadores de células inflamatórias investigados apresentaram correlação com os dados clínico patológicos das pacientes. Em CEC HPV *independente*, a expressão fraca de S100 na região peritumoral demonstrou estar relacionada com a ocorrência de metástase linfonodal ($p=0,008$). Na região intratumoral, a pouca infiltração desse tipo celular também acarretou piores resultados clínicos como invasão perineural ($p=0,007$), metástase linfonodal ($p=0,043$) e associação com estadiamento FIGO III e IV ($p=0,055$).

A expressão de S100 reflete a presença de células dendríticas que, ao infiltrar tumores, desencadeia o processo de ativação do mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro. As células dendríticas ao se infiltrar em regiões neoplásicas iniciam a captura e processamento dos antígenos liberados pelas células tumorais. Após esse processo, ocorre a migração dessas células para o linfonodo, onde sugere-se que ocorra a ativação da resposta imune antitumoral ¹⁸⁹.

Dessa forma, as células dendríticas desempenham uma função importante na regulação das respostas imunes inatas e adaptativas. Há diversos estudos na literatura que sugerem que progressão tumoral estaria associada a redução na expressão de proteínas dessas células, acarretando menores índices de sobrevida e pior prognóstico em pacientes com neoplasias. Esse desfecho clínico possivelmente seria consequência do déficit na resposta imune ao tumor e deficiência de linfócitos T ¹⁹⁰, como observado em pacientes com câncer de mama ¹⁷⁵ (Iwamoto et al. 2003), pancreático ¹⁷⁷, gástrico ^{176,191} e colorretais ^{192,193}.

No entanto, o papel das células dendríticas ainda é controverso acerca de sua eficiência no controle da progressão et al. Tumoral ^{189,194}.

Há relatos na literatura que indicam que a expressão desregulada de S100, mais especificamente a regulação positiva, está associada a progressão de diversos tipos tumorais como mama, pulmão e melanoma. Contudo, na prática clínica tem apresentado diversas aplicabilidades como: marcador diagnóstico promissor, fator determinante de tratamento, no monitoramento quanto à eficácia terapêutica e para prever o prognóstico da doença ¹⁹⁴⁻¹⁹⁷.

No que diz respeito ao prognóstico de células S100 em outros tumores, Lee et al.¹⁹⁸ observaram uma correlação inversa entre a expressão acentuada de S100 e o carcinoma endometrial, concluindo que a infiltração dessas células pode ser adotada como marcador patológico para esse tumor.

Outro estudo em neoplasia endometrial relatou que a infiltração de S100 parece ser um fator de prognóstico favorável e que o maior número dessas células caracteriza melhor prognóstico¹⁹⁹. Outras neoplasias como colorretais, pulmonares e esofágicos também demonstraram que a expressão aumentada de S100 se associaram a prognósticos favoráveis²⁰⁰⁻²⁰².

Ainda em carcinoma endometrial, Honig et al.²⁰³ observaram que as amostras que tinham expressão pobre de S100 pareciam se relacionar com estádios FIGO mais avançados. Essas últimas análises assemelham-se aos resultados obtidos nesse estudo para câncer de vulva acerca da relação entre a expressão do marcador e estadiamento.

Em concordância aos nossos resultados quanto a expressão de S100 e a ocorrência de metástase, um estudo de carcinoma de mama demonstrou que a elevada expressão de S100 pode atuar como marcador preditivo para metástases nessa neoplasia, uma vez que a baixa expressão relaciona-se com a ocorrência desse evento²⁰⁴. Já para carcinoma de pulmão^{205,206} e melanoma^{207,208}, a alta expressão do marcador está relacionada a ocorrência de metástase cerebral.

Quanto a infiltração de S100 e a ocorrência de invasão perineural, ainda há escassez de dados sobre a presença do infiltrado celular associado a invasão perineural.

Isso porque o anticorpo S100 é um imunomarcador adotado para detectar estruturas em cuja composição consta a proteína S100, a exemplo de células nervosas epiteliais ou gliais, glândulas e melanócitos^{209,210}. Para esses casos, há numerosos estudos reportando o uso de S100 e classificando-o como marcador prognóstico independente de invasão perineural, inclusive para o carcinoma de vulva²¹¹.

Entretanto, no nosso trabalho identificamos o perfil do infiltrado inflamatório apenas com relação a invasão. Assim, observamos um maior infiltrado na ausência de invasão profunda, sugerindo que em estádios mais avançados, essas células estão pouco expressas no tumor.

Em CEC HPV *associado*, S100 não mostrou associação com características clínico patológicas, todavia a expressão aumentada apresentou uma associação favorável com a sobrevida livre de doença ($p=0,057$). A relação entre a expressão de S100 com a sobrevida livre de doença também é pouco relatada na literatura para outras neoplasias. Para

carcinoma de pulmão não pequenas células, foi relatado uma relação favorável com a sobrevida global, com o aumento da expressão relacionado ao melhor índice de sobrevida ²¹².

Em câncer de mama do tipo receptores de estrogênio positivo (ER+), os pesquisadores Yen et al. ²⁰⁴ também concluíram que a alta expressão de S100 prevê uma sobrevida global superior nesses pacientes. Por outro lado, em câncer de cólon recidivado no pós operatório, o aumento da expressão de S100 demonstra ter taxas de sobrevida global significativamente inferiores àqueles que não apresentam superexpressão ²¹³. O mesmo é relatado para o melanoma, com elevadas expressões indicando pior sobrevida global e livre de doença ^{207,214,215}.

Via de regra, a expressão aumentada da proteína S100 está relacionada às características negativas, como: pouca diferenciação tumoral, agressividade, relação com estádios avançados e ocorrência de metástase. Para tanto, em grande parte dos casos, a expressão de S100 é considerada como pior prognóstico para a sobrevida dos pacientes. Não obstante, estudos recentes têm mostrado que essa classificação de forma generalizada é equivocada, visto que essas proteínas podem desempenhar papéis positivos e negativos ²¹⁶.

No nosso trabalho, analisamos também expressão de CD1a, um marcador expresso pelas células de Langerhans, que são células dendríticas imaturas derivadas da medula óssea ¹⁷⁴. As moléculas CD1 estão envolvidas na ativação de células T e são as principais responsáveis por vincular a imunidade inata à adaptativa. Devido à presença das células dendríticas ou células de Langerhans no epitélio, o sistema imunológico é rapidamente comunicado da ocorrência de proliferação neoplásica, especialmente em carcinomas ^{174,217}.

A associação direta entre a densidade de CD1a e o resultado clínico é observada em diversos tipos tumorais, sugerindo uma possível associação entre sua expressão e a capacidade de apresentação de moléculas associadas a tumores ao sistema imune. Assim, CD1a pode ter um papel importante na apresentação de antígenos tumorais ao sistema imunológico. No entanto, esse mecanismo pode sofrer ação das células tumorais através da inibição de sua expressão com o intuito de induzir uma imunossupressão eficaz à resposta antitumoral ¹⁴⁹.

Um estudo recente em carcinoma de células escamosas do lábio inferior reportou uma redução do número de células CD1a comparado ao epitélio normal, sugerindo que esse decréscimo na expressão poderia representar uma etapa crucial para o desenvolvimento tumoral ¹⁹⁰.

Em nosso estudo, nós observamos que as células CD1 estavam localizadas no

microambiente peri e intratumoral, sendo que ambas as regiões apresentaram características de melhor prognóstico para as duas vias estudadas. Essa infiltração é sugestiva de imogenicidade tumoral, uma vez que tumores que evadem ao sistema imune não apresentam características inflamatórias e, portanto, são caracterizados pela pouca expressão de células apresentadoras de antígenos e linfócitos ²¹⁸. Diversos fatores derivados do tumor podem realizar o recrutamento das células dendríticas ao ambiente tumoral, entretanto diversos fatores derivados do tumor podem recrutar células dendríticas para o local do tumor, mas subsequentemente podem impedir sua diferenciação e maturação em células apresentadoras de antígeno funcionais ²¹⁹.

Ao analisar o perfil de expressão de CD1a em relação as características clínico-patológicas, nossos resultados mostraram associação significativa entre a alta expressão de CD1a e a ausência de invasão vascular + perineural na via de CEC *HPV associado* ($p=0,059$). A invasão perineural (PNI, do inglês *perineural invasion*) é encontrada em diversos tumores malignos, sendo um indício de metástase e invasão, que pressagia o mal curso da doença ²²⁰. Esse processo ocorre quando as células tumorais circundam ou invadem camadas da bainha neural ²²¹.

Em vários tipos de câncer, a PNI tem conexão com o aumento da mortalidade, com a recorrência e piores resultados. Sugere-se que a PNI possa caracterizar um mecanismo de recorrência em tumores mínima- e profundamente invasivos. Com isso, a presença de PNI, independente da profundidade de invasão, remete o ao aumento no risco de recorrência, havendo a necessidade de se considerar essa característica no planejamento do tratamento ^{211,221}.

Em carcinoma de vulva, Holthoff et al. ²¹¹ sugeriram que o envolvimento neural corresponde a uma fração significativa de recorrência local, contudo não possui relação com a ocorrência de metástases regionais, tampouco com a profundidade de invasão. Nesse caso, a PNI pode funcionar como um reservatório de células neoplásicas, o qual protege essas células do reconhecimento imunológico, permitindo o crescimento recorrente ou a disseminação para locais próximos. A invasão do espaço vascular parece desempenhar o mesmo papel que a PNI para o carcinoma vulvar, posto que é bastante relatado na literatura sua relação com o risco de recorrência, além de representar um fator independente de pior sobrevida câncer específica ⁶⁰.

A associação entre invasão vascular + perineural e a expressão de CD1a encontra uma associação significativa entre esse marcador inflamatório e outras características clínico-patológicas, o que indica que a ausência de expressão de CD1a provavelmente está

relacionada ao pior prognóstico e progressão da doença em determinadas neoplasias. A melhora do desfecho clínico associado ao aumento na densidade de CD1a nas regiões peri- e intratumorais é relatada em câncer de ovário, mama e carcinoma espinocelular de língua ^{149,224–226}.

Jardim et al. ¹⁷⁴ encontraram o menor número de CD1a associado a ocorrência de metástase linfonodal, em consonância com o achado de Goldman et al. ²²⁷, para o carcinoma de língua. Essa mesma associação também foi observada em carcinoma de cólon ¹⁹². É sabido que a ocorrência de metástase linfonodal é um processo crítico de progressão tumoral, que pode determinar o curso da doença, sendo considerado um dos fatores prognósticos mais importantes em diversas neoplasias ¹⁷⁴. Dessa forma, entende-se que os dados reportados na literatura corroboram com os nossos de que a atuação de células dendríticas CD1a estejam atuando na tentativa de impedir a progressão da doença.

O impacto da expressão de CD1a também foi notado para as sobrevidas. Os nossos resultados mostraram que, para ambas as vias de CEC vulvar, o infiltrado inflamatório mais denso na região peritumoral apresentou melhores taxas de sobrevida livre de doença (SLD) (via CEC HPV *independente*, $p=0,045$; via CEC HPV *associado*, $p=0,008$). De modo similar aos nossos achados, em carcinoma de laringe e CEC oral, os autores observaram a mesma correlação entre o infiltrado de CD1a e sobrevida livre de doença ^{174,178}. No carcinoma de células escamosas de língua, NI et al. ²²⁸ encontraram relação não somente entre a alta expressão de CD1a e a melhor diferenciação e estádios clínicos iniciais, como também o aumento da sobrevida livre de doença, sugerindo CD1a como potencial marcador prognóstico nesse tipo tumoral. No carcinoma de mama não houve associação significativa entre a maior concentração de CD1a e a sobrevida ^{175,229}.

Ainda se tratando da expressão de CD1a, nossos resultados evidenciaram que, em para ambas as vias estudadas, houve uma associação negativa entre a alta a expressão do marcador na região intratumoral e a sobrevida global (para a via de HPV *independente*, $p=0,059$; HPV *associado*, $p=0,057$).

De modo oposto, ao que foi observado para o infiltrado peritumoral, no qual as células inflamatórias desempenhavam um papel antitumoral, a presença das células na região intratumoral parece estar contribuindo para a progressão do tumor.

No que se refere ao papel da expressão intratumoral de CD1a em relação à sobrevida, Sandel et al. ²³⁰ reportaram em câncer colorretal um resultado similar ao que encontramos para o carcinoma vulvar. Eles demonstraram que pacientes com expressão relativamente alta de CD1a na margem de avanço do tumor apresentaram uma sobrevida livre de doença

menor. Além disso, eles observaram que as células dendríticas tinham locais de preferência para infiltração na região tumoral. Em carcinoma oral, a análise de infiltrado de CD1a na região intratumoral não apresentou nenhuma associação significativa ¹⁷⁴.

Já em carcinoma de cabeça e pescoço o elevado número de células dendríticas no compartimento intratumoral foi associado a um prognóstico melhor em termos de recorrência ²³¹. A função de CD1a é controversa em relação aos diferentes tipos tumorais e localização do infiltrado dessas células. Recentemente, Jiao et al. ²³² sugeriram que as expressões de PD-L1 e PD-L2 podem influenciar as funções de CD1a na região intratumoral, podendo acarretar a regulação negativa das respostas imunes antitumorais em carcinoma cutâneo.

Nossos resultados também demonstraram melhor prognóstico em relação a expressão do marcador perforina na via de CEC HPV *associado*. Os dados evidenciaram que a elevada expressão desse marcador se relacionou a invasão da derme superficial e média, enquanto a baixa expressão foi relacionada com invasões mais profundas, a exemplo: derme profunda e subcutânea, para as regiões peri ($p=0,013$) e intratumoral ($p=0,022$).

O papel das perforinas é absolutamente essencial para a função dos linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês “*cytotoxic T lymphocytes*”) na homeostase imunológica do hospedeiro ²³³. Isso ocorre porque os CTL e as células natural killer (NK) são responsáveis pela defesa do organismo contra células tumorais ou infectadas por vírus ²³⁴. Nesse contexto, as células NK e os linfócitos T citotóxicos empregam a perforina, uma potente proteína que atua formando um poro em membranas celulares que permite a passagem de granzimas para o citoplasma de células-alvo ²³⁵. As funções sinérgicas de perforina e granzima induzem a morte das células-alvo pela ruptura da membrana plasmática e/ou pela indução da apoptose ²³⁶.

Devido a importância dessa proteína, alterações em suas quantidades podem acarretar consequências diretas na vigilância imunológica tumoral em humanos. Estudos recentes mostraram a expressão de perforina pode ser adotada como um importante biomarcador de prognóstico. Em câncer de pulmão em estádios avançados, a expressão aumentada de perforina foi positivamente associada ao aumento de sobrevida ¹⁸⁷. Em linfoma não Hodgkin, foi observada menor sobrevida relacionada à diminuição na expressão de perforina e granzima B, demonstrando que a resposta imune prejudicada foi o responsável pela piora na evolução da doença ²³⁴. KONTANI et al. ²³⁷ observou em seus resultados que a perforina e granzima B podem atuar na supressão de metástase de células cancerosas para os linfonodos regionais, perdendo a capacidade de invadir os vasos

linfáticos ou de se espalhar para os linfonodos regionais e, portanto, predizer o prognóstico. Os resultados desses estudos estão em congruência com os nossos achados e ressaltam a importância do papel da perforina como agente antitumoral.

Ao analisar a expressão de CD56, nossos resultados mostraram que a alta marcação da proteína em questão se correlacionou inversamente à sobrevida global em pacientes da via de CEC HPV *associado* ($p=0,043$).

As células natural-killer (NK), são um importante componente do sistema imunológico inato, definidas fenotipicamente por sua expressão de CD56. Possuem a capacidade de lisar células-alvo sem a necessidade de sensibilização prévia, uma vez que produzem citocinas e quimiocinas imunorreguladoras que fazem varredura das células a procura de marcadores de infecção, transformação e sinais de estresse celular. Quando ativados, eles podem liberar instantaneamente grânulos citotóxicos pré-formados compostos por perforina e granzimas. Assim, possuem papel fundamental nas reações imunológicas subsequentes a células infectadas ou cancerosas e recrutando as células do sistema imunológico adaptativo^{238,239}.

Em um estudo anterior realizado em carcinoma vulva, Sznurkowski et al.¹⁸⁶ relataram que a alta intensidade de expressão de CD56 foi significativamente relacionada a profundidade de invasão e recorrência. Nesse estudo, os pacientes em estádios mais avançados apresentavam maior infiltração de CD56, sugerindo que as infiltrações dessas células coincidem com as formas mais agressivas da doença. Ainda nesse estudo, os autores não encontraram associação com a sobrevida. No entanto, o autor não fez a separação entre as vias estabelecidas para o CEC vulvar.

De forma semelhante, em um estudo recente de melanoma, os autores concluíram com base uma análise multivariada que a abundância de células NK CD56 se correlacionaram negativamente com a sobrevida global, da mesma forma que com metástases distantes²⁴⁰. Para leucemia mieloide aguda, Alegretti et al.²⁴¹ sugeriram que a expressão de CD56 pode ser indicativo um fator de pior prognóstico, uma vez que está associado a menor sobrevida global dos pacientes. Em carcinoma seroso de ovário, a expressão de CD56 aumentou na mesma medida que o estágio do tumor. Além disso, análise univariada os autores encontraram associação da expressão de CD56 com a disseminação e invasão tumoral, traduzindo em relevância prognóstica²⁴².

Contrariamente a todos esses achados, Wagner et al.²⁴³ concluíram que a presença e a distribuição diferenciada de células NK citotóxicas parecem ter responsabilidade pela melhor sobrevida atribuída a um subgrupo de pacientes, de maneira especial aos associados

ao HPV, em um estudo de carcinoma celular de orofaringe.

Um marcador de células inflamatórias que está mais em evidência atualmente devido a sua importância na imunoterapia e que optamos por estudá-lo nas diferentes vias de CEC vulvar é o PD-L1. Essa proteína corresponde ao ligante de morte celular programada (do inglês, “*programmed death ligand -1*”), considerada um co-inibidor da resposta imune, o qual tem como receptor o PD-1 (do inglês, “*Programmed death-1*”). As células tumorais têm diversas formas de suprimir a resposta imune a fim de resistir à imunidade antitumoral. Um desses métodos é através da modificação da via PD-1 / PD-L1, conhecido como “*immune checkpoint*”, que atua na inibição de células T^{244,245}. Essa via pode ter funções contraditórias uma vez que pode atuar no controle da ativação imunológica excessiva, assim como parecer ser a forma com que os tumores escapam do sistema imunológico. De tal modo, a ativação dessa via pode promover a evasão à resposta imune e o crescimento tumoral. A alternativa promissora para reversão da imunossupressão mediada pelo tumor é através do bloqueio da via PD-1 / PD-L1²⁴⁶.

Geralmente PD-L1 é expresso em condições inflamatórias, além de ser expressos em células tumorais como “*mecanismo imune adaptativo*” para evadir à resposta imune, implicando na progressão neoplásica. A inibição da expressão de PD-L1 através dos inibidores de checkpoint imunológico suscita o restabelecimento da resposta imune antitumoral e demonstrou aumentar a sobrevida global e livre de progressão em neoplasias epiteliais²⁴⁷⁻²⁴⁹.

Ainda assim, o valor prognóstico de PD-L1 é controverso. Sua expressão aparece associada a resultados clínicos ruins em diversos tipos de câncer se expressos pelas células tumorais, embora quando expressos no infiltrado inflamatório imune, se correlaciona com melhor sobrevida^{244,250-257}.

Nossos resultados evidenciaram que, em CEC vulvar *HPV associado*, a expressão aumentada de PD-L1 na região peritumoral se correlacionou com a ausência de invasão perineural ($p=0,056$) e com o aumento na sobrevida livre de doença ($p=0,021$). Esses achados são similares ao encontrado por Sznurkowski et al.²⁵⁸ para o carcinoma de vulva, o qual foi observado que a positividade de expressão de PD-L1 de células imunes peritumorais foi considerado um fator prognóstico favorável e independente para sobrevida global em casos tratados cirurgicamente.

Em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço a elevada expressão de PD-L1 no infiltrado inflamatório, não nas células tumorais foi associada a fatores prognósticos favoráveis²⁵⁹. No carcinoma de células escamosas oral, a expressão

aumentada de PD-L1 correlacionou-se a invasão vascular ²⁶⁰. Para o carcinoma espinocelular cutâneo de alto risco de cabeça e pescoço, a expressão de PD-L1 em células tumorais primárias, células imunitárias primárias e células imunitárias metastáticas foram associadas ao aumento de sobrevida livre de doença ²⁶¹. Quanto ao melanoma metastático, a expressão positiva de PD-L1 foi significativamente associada à sobrevida global aumentada ²⁶². Já em carcinoma espinocelular hipofaríngeo, a expressão de PD-L1 não apresentou associação com prognóstico ²⁶³. Em carcinoma de mama triplo negativo, a expressão de PD-L1 em células imunes foi um fator de mau prognóstico ²⁶⁴.

A literatura é infindável quando se trata de PD-L1, uma vez que há um interesse quanto ao bloqueio da via PD-1 / PD-L1 para tratar tumores mais agressivos, o qual a imunoterapia seria uma abordagem menos invasiva e confiável. Assim, nossos resultados sugerem que em CEC vulvar do tipo *HPV associado*, a presença do infiltrado inflamatório de PD-L1 na região peritumoral é indicativa de bom prognóstico, uma vez que tem impacto na sobrevida e caracteriza tumores com ausência de invasão perineural. Nossos resultados são inéditos e podem contribuir para a adoção de abordagens menos invasivas e que atendem às expectativas quanto a eficácia e redução das limitações provenientes dos métodos padrões atualmente utilizados.

Por fim, nossos resultados mostraram duas características clínico-patológicas como preditivas de menor sobrevida para o CEC HPV *independente*. Uma delas é a invasão do espaço vascular, o qual a presença dessa característica remete a uma menor taxa de sobrevida global ($p=0,025$). A invasão vascular ocorre quando as células neoplásicas atingem os lúmens capilares do sistema de drenagem linfático ou microvascular dentro do tumor primário, muito encontrado na literatura com a denominação “linfovascular”. Essa característica foi amplamente estudada em outras neoplasias ginecológicas como câncer endometrial ^{265–270}, cervical ^{271–276}, ovário ²⁷⁷ e no vulvar ^{278–280}. Nesses estudos, a presença de invasão linfovascular esteve associada ao aumento do risco de disseminação da doença, especialmente metástase linfonodal, aumento da chance de recorrência e redução da sobrevida. Dessa forma, é esperado que a invasão vascular tenha impacto negativo quando presente, conforme observamos nesse estudo.

Ademais, nossos resultados evidenciaram impacto na sobrevida livre de doença em CEC de vulva HPV *independente* quando há invasão vascular + perineural ($p=0,045$).

Conforme discutimos anteriormente, a invasão vascular é um fator reconhecido de mau curso da doença. A invasão perineural também é um fator intrinsecamente relacionado ao mau prognóstico que pode ser definida como a presença de células neoplásicas dentro de

uma das três camadas da bainha nervosa (endoneuro, perineuro e epineuro) ou de tumor presente nas proximidades de um nervo e envolvendo pelo menos um terço da circunferência de sua circunferência ²²¹.

O pesquisador Long et al. ²⁸¹ reportaram recentemente em seu estudo que a invasão perineural se associou a uma sobrevida livre de doença e global significativamente menores em CEC vulvar tratados cirurgicamente. Holthoff et al. ²¹¹ observou a invasão perineural em CEC vulvar associada ao maior risco de recorrência da doença. Em carcinoma cervical, os tempos de sobrevida global e livre de doença foram menores em pacientes com invasão perineural, sendo considerado fator de mau prognóstico ²⁸². Além dessas, estão relacionadas a desfechos clínicos desfavoráveis e levado risco de recorrência loco-regional em carcinomas como: cabeça e pescoço ²⁸³⁻²⁸⁵, cutâneo de células escamosas ²⁸⁶, próstata ²⁸⁷, pancreático ²⁸⁸, gástrico ²⁸⁹ e cólon ²⁹⁰.

Os dados referentes a invasão perineural em carcinoma vulvar são escassos. Entretanto, os que constam na literatura sugerem que a presença dessa característica está relacionada a um comportamento biológico agressivo e demonstram que esse achado é considerado uma variável prognóstica independente de risco de recorrência e de morte em muitos casos ^{36,37,211}. Invasões de grande extensão foram associadas a risco elevado de metástase linfonodal e morte, o que pode estar relacionado aos fatores de risco associados ²⁹¹. Assim, nossos dados parecem de acordo com os achados que constam na literatura de que a invasão perineural, bem como a do espaço vascular, parecem se relacionarem ao pior prognóstico e mau curso da doença.

Em suma, os nossos principais achados nesse estudo foram:

- Com relação a expressão dos marcadores, tanto para CEC HPV *independente*, quanto para HPV *associado*, houve uma tendência de maior expressão na região peritumoral. As exceções foram para CD1a em ambas as vias, o qual apresentaram maior expressão na região intratumoral e CD56, que demonstrou maior infiltrado inflamatório na região intratumoral para CEC HPV *associado*;
- Perforina foi o único marcador que apresentou diferença significativa de expressão tanto na região intra, quanto peritumoral na via de HPV *independente*.
- Para as vias de CEC HPV *independente* e HPV *independente*, todos os marcadores de células inflamatórias imunes apresentaram significância estatística no que se referente a maior concentração dessas células entre as regiões peri e intratumorais, exceto CD56.
- Pacientes de CEC HPV *independente*, os dados clínico patológicos apresentaram associação estatística com S100. A expressão intensa desse marcador associou-se a:

- a ausência de invasão perineural, quando expresso na região intratumoral;
 - ausência de metástase linfonodal, quando expressos na região intra- e peritumoral;
 - estadiamento FIGO I e II, quando aumentado na região intratumoral.
- Pacientes de CEC *HPV associado*:
 - a expressão aumentada de Perforina em ambas as regiões (peri e intratumora) apresentaram associação significativa com menor profundidade de invasão (derme superficial e média);
 - a maior expressão de CD1a na região peritumoral associou-se com a ausência de invasão vascular + perineural;
 - a expressão intensa de PD-L1 na região peritumoral esteve correlacionada com a ausência de invasão perineural.
 - Em relação às sobrevidas associadas as características clínico-patológicas:
 - em CEC *HPV independente*, a presença de invasão vascular é um fator de menor sobrevida global;
 - também para a via de CEC *HPV independente*, a presença de invasão vascular + perineural é um fato determinante de menor sobrevida livre de doença.
 - Quanto a sobrevida em relação aos marcadores inflamatórios:

Para a via de CEC *HPV independente*:

- a alta expressão de CD1a na região intratumoral correlacionou-se negativamente com a sobrevida global das pacientes;
- a expressão aumentada de CD1a na região peritumoral demonstrou estar associada a uma melhor sobrevida livre de doença.

Para a via de CEC *HPV associado*:

- a expressão de CD56 intensa na região peritumoral apresentou relação com menores índices de sobrevida global;
- a alta expressão de S100 na região intratumoral acarretou um aumento na sobrevida livre de doença;
- a expressão aumentada de CD1a na região intratumoral esteve relacionado a menor sobrevida global;

- a maior expressão de CD1a no infiltrado inflamatório peritumoral associou-se a maior sobrevida livre de doença;
- a intensa expressão de PD-L1 na região peritumoral esteve correlacionada com a maior taxa de sobrevida livre de doença.

6 CONCLUSÕES

1. Esse estudo permitiu identificar as proteínas constituintes do infiltrado inflamatório peri e intratumoral no carcinoma vulvar HPV *independente* e HPV *independente*.
2. A invasão vascular e a invasão vascular + perineural demonstraram ser fatores independentes de pior prognóstico em CEC HPV *independente*.
3. Os perfis de imunexpressão das células inflamatórias mostram desempenhar papéis diferentes, com potenciais benéficos e maléficos, o qual se diferiram de acordo com a via etiológica.
4. Ambas as vias estiveram correlacionadas com características clínico-patológicas e com as sobrevidas.
5. A via de CEC HPV *associado* possui um infiltrado inflamatório sugestivo de melhor prognóstico, visto suas diversas associações positivas com características clínico-patológicas favoráveis e sobrevida.
6. As diferenças observadas sugerem que abordagens imunoterapêuticas distintas devem ser adotadas, levando-se em conta o status do HPV.
7. As células inflamatórias estudadas podem servir de base para um tratamento individual e direcionado, visando abordagens mais conservadoras e imuno-específicas. O desenvolvimento de novas terapias que superem as desvantagens das terapias padrão são extremamente necessárias para o carcinoma vulvar.

7 REFERÊNCIAS

1. Foster DC. Vulvar disease. *Obstetric Gynecol.* 2002;100(1):145-63.
2. Fonseca-Moutinho JA. [Vulvar intraepithelial neoplasia: a current problem]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;30(8):420–6.
3. Martins O. Vulva. In: Lima G, Gebrim L, Oliveira V, Martins N, editors. *Ginecologia oncológica.* Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 1999. p.266–82.
4. Montag A, Kumar V. O sistema genital feminino e a mama: vulva. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editors. *Robbins patologia básica.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.776–9.
5. Lakhwani P, Agarwal P, Mahajan JA, Goel A, Pande P, Mehta S, et al. Surgical management of carcinoma vulva-case series and review of literature. *Indian J Surg Oncol.* 2019;10(2):324–8.
6. Pinto AP. Etiopatogenia do câncer vulvar. *J Bras Patol Med Lab.* 2002;38(1):55–63.
7. Moore, DH, Koh W, McGuire WP, Wilkinson EJ. Vulva. In: Hoskins W, Peres C, Young R, Barakat R, editors. *Principles and practice of gynecologic oncology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.665–706.
8. Buxant F, Anaf V, Haouari H. Rapid groin recurrence of a vulvar carcinoma with invasion of the femoral vessels and the importance of the initial groin dissection in the staging surgery. *Acta Chir Belg.* 2005 Aug;105(4):418-9.
9. Alkatout I, Schubert M, Garbrecht N, Weigel MT, Jonat W, Mundhenke C, et al. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. *Int J Womens Health.* 2015;7:305–13.
10. Rakislova N, Saco A, Sierra A, Pino M, Ordi J. Role of human papillomavirus in vulvar cancer. 2017;24(4):201–14.
11. Hinten F, Molijn A, Eckhardt L, Massuger LFAG, Quint W, Bult P, et al. Gynecologic Oncology Vulvar cancer : Two pathways with different localization and prognosis. *Gynecol Oncol.* 2018;149(2):310–7.
12. Williams A, Syed S, Velangi S, Ganesan R. New directions in vulvar cancer pathology. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(10):88.
13. 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.

14. Faber MT, Sand FL, Albieri V, Norrild B, Kjær SK, Verdoodt F. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva. *Int J Cancer*. 2017;141(6):1161–9.
15. Ragnarsson-Olding BK, Nilsson BR, Kanter-Lewensohn LR, Lagerlöf B, Ringborg UK. Malignant melanoma of the vulva in a nationwide, 25-year study of 219 Swedish females: predictors of survival. *Cancer*. 1999;86(7):1285–93.
16. Piura B. Management of primary melanoma of the female urogenital tract. *Lancet Oncol*. 2008;9(10):973–81.
17. Tan A, Bieber AK, Stein JA, Pomeranz MK. Diagnosis and management of vulvar cancer: a review. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(6):1387–96.
18. Holschneider C, Berek J. Câncer de vulva. In: Berek J, editor. *Tratado de ginecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.1234-62.
19. Rogers LJ, Cuello MA. Cancer of the vulva. *Int J Gynecol Obstet*. 2018;143:4–13.
20. Sirota M, Kostopoulou O, Round T, Samaranayaka S. Prevalence and alternative explanations influence cancer diagnosis: an experimental study with physicians. *Head Psychol*. 2017;36(5):477–85.
21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
22. van de Nieuwenhof HP, Massuger LF, van der Avoort IA, Bekkers RL, Casparie M, Abma W, et al. Vulvar squamous cell carcinoma development after diagnosis of VIN increases with age. *Eur J Cancer*. 2009;45(5):851–6.
23. Eva LJ, Sadler L, Fong KL, Sahota S, Jones RW, Bigby SM. Trends in HPV-dependent and HPV-independent vulvar cancers: the changing face of vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2020;157(2):450–5.
24. Hemminki K, Li X, Vaittinen P. Time trends in the incidence of cervical and other genital squamous cell carcinomas and adenocarcinomas in Sweden, 1958-1996. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;101(1):64–9.
25. Herzog TJ. Invasive cancer of the vulva. In: DiSaia PJ, Creasman, WT, Mutch DG. *Clinical gynecologic oncology*. New York: Elsevier; 2018. p.190-216.e6.
26. National Cancer Institute-NCI. Cancer Stat Facts: Vulvar cancer. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html>. [2020 out 20]
27. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7–30.

28. Mantovani G, Fragomeni SM, Inzani F, Fagotti A, Corte L Della, Gentileschi S, et al. Molecular pathways in vulvar squamous cell carcinoma: implications for target therapeutic strategies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020;146(7):1647–58.
29. 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(1):45–9.
30. de Melo Maia B, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues LS, Coutinho-Camillo CM, Baiocchi G, Stiepcich MM, et al. microRNA portraits in human vulvar carcinoma. *Cancer Prev Res*. 2013;6(11):1231–41.
31. Oncoguia I. Dados estatísticos para câncer de vulva. 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/dados-estatisticos-para-cancer-de-vulva/10387/478/>. [2020 out 20]
32. Dittmer C, Katalinic A, Mundhenke C, Thill M, Fischer D. Epidemiology of vulvar and vaginal cancer in Germany. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284(1):169–74.
33. 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):1–6.
34. Brinton LA, Thistle JE, Liao LM, Trabert B. Epidemiology of vulvar neoplasia in the NIH-AARP Study. *Gynecol Oncol*. 2017;145(2):298–304.
35. Hami LT, Lampe B, Mallmann P, Forner DM. The impact of age on the prognosis of vulvar cancer. *Oncol Res Treat*. 2018;41(9):520–4.
36. Ferrari F, Forte S, Ardighieri L, Bonetti E, Fernando B, Sartori E, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in primary squamous cell vulvar cancer: the role of perineural invasion in recurrence and survival. *Eur J Surg Oncol*. 2019;45(11):2115–9.
37. Salcedo MP, Sood AK, dos Reis R, Ramalingam P, Chen C, Frumovitz M, et al. Perineural invasion (PNI) in vulvar carcinoma: a review of 421 cases. *Gynecol Oncol*. 2019;152(1):101–5.
38. Woelber L, Jaeger A, Prieske K. New treatment standards for vulvar cancer 2020. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2020;32(1):9–14.
39. Singh N, Gilks CB. Vulval squamous cell carcinoma and its precursors. *Histopathology*. 2020;76(1):128–38.
40. Weinberg D, Gomez-Martinez RA. Vulvar cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2019;46(1):125–35.

41. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2013;62(1):161–75.
42. Lebreton M, Carton I, Brousse S, Lavoué V, Body G, Levêque J, et al. Vulvar intraepithelial neoplasia: classification, epidemiology, diagnosis, and management. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2020;49(9):101801.
43. 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(1):71–83.
44. Zhang J, Zhang Y, Zhang Z. Prevalence of human papillomavirus and its prognostic value in vulvar cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204162.
45. Nogueira MC, Guedes Neto EDP, 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(3):153–7.
46. Acker N. Vulvar cancer. In: Berek J, Hacker N, editors. *Berek and Hacker's gynecologic oncology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.536–75.
47. Francis JA, Eiriksson L, Dean E, Sebastianelli A, Bahoric B, Salvador S. No. 370- Management of squamous cell cancer of the vulva. *J Obstet Gynaecol Canada*. 2019;41(1):89–101.
48. Dasgupta S, Ewing-Graham PC, Swagemakers SMA, van der Spek PJ, van Doorn HC, Noordhoek Hegt V, et al. Precursor lesions of vulvar squamous cell carcinoma – histology and biomarkers: a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;147(December 2019):102866.
49. Wohlmuth C, Wohlmuth-Wieser I. Vulvar malignancies: an interdisciplinary perspective. *JDDG - J Ger Soc Dermatology*. 2019;17(12):1257–76.
50. Zięba S, Chechlińska M, Kowalik A, Kowalewska M. Genes, pathways and vulvar carcinoma - New insights from next-generation sequencing studies. *Gynecol Oncol*. 2020;158(2):498–506.
51. Clancy AA, Spaans JN, Weberpals JI. The forgotten woman's cancer: vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) and a targeted approach to therapy. *Ann Oncol*. 2016;27(9):1696–705.
52. Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG, Du Q, Malkki M, Wilkerson H-W, et al. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(7):1790–

- 9.
53. Tyring SK. Vulvar squamous cell carcinoma: guidelines for early diagnosis and treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(3 SUPPL.):17–23.
 54. Stroup A, Harlan L, Trimble E. Demographic, clinical, and treatment trends among women diagnosed with vulvar cancer in the United States. *Gynecol Oncol* 2008. 2008;108(1):577–83.
 55. Oncocentro F. Registro do câncer no estado de São Paulo. Site. 1990.
 56. Vasquez-Clarfield B, Duffy-Weiser. Vulvar and vaginal cancers. In: Site-specific cancer series: gynecologic cancers. 2010. p.127–38.
 57. Zweizig S, Korets S, Cain JM. Key concepts in management of vulvar cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2014;28(7):959–66.
 58. te Grootenhuys NC, Pouwer AW, de Bock GH, Hollema H, Bulten J, van der Zee AGJ, et al. Margin status revisited in vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2019 Aug;154(2):266-275.
 59. Canavan TP, Cohen D. Vulvar cancer. *Am Fam Physician.* 2002;66(7):1269–74.
 60. De Jong RA, Toppen NL, Ten Hoor KA, Boezen HM, Kema IP, Hollema H, et al. Status of cellular immunity lacks prognostic significance in vulvar squamous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012;125(1):186–93.
 61. Baiocchi G, Cestari FMS, Rocha RM, Faloppa CC, Kumagai LY, Fukazawa EM, et al. Does the count after inguinofemoral lymphadenectomy in vulvar cancer correlate with outcome? *Eur J Surg Oncol.* 2013;39(4):339–43.
 62. Woelber L, Trillsch F, Kock L, Grimm D, Jaenicke F, Petersen C, et al. Management of patients with vulvar cancer: A perspective review according to tumour stage. *Ther Adv Med Oncol.* 2013;5(3):183–92.
 63. Euscher ED, Malpica A. Gynaecological malignancies and sentinel lymph node mapping: an update. *Histopathology.* 2020;76(1):139–50.
 64. Klapdor R, Wölber L, Hanker L, Schmalfeldt B, Canzler U, Fehm T, et al. Predictive factors for lymph node metastases in vulvar cancer. An analysis of the AGO-CaRE-1 multicenter study. *Gynecol Oncol.* 2019;154(3):565–70.
 65. Nica A, Covens A, Vicus D, Kupets R, Gien LT. Long term outcomes in patients with sentinel lymph nodes (SLNs) identified by injecting remaining scar after previously excised vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2019;155(1):83–7.
 66. Papadia A, Ehm L, Gasparri ML, Wang J, Radan AP, Mueller MD. Unilateral versus bilateral lymph-nodal metastases and oncologic outcome in vulvar cancer patients. *J*

- Cancer Res Clin Oncol. 2020;146(7):1877–81.
67. De Gregorio N, Ebner F, Schwentner L, Friedl TWP, Deniz M, Látó K, et al. The role of preoperative ultrasound evaluation of inguinal lymph nodes in patients with vulvar malignancy. *Gynecol Oncol.* 2013;131(1):113–7.
 68. 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(1):147–52.
 69. Te Grootenhuis NC, Van Der Zee AGJ, Van Doorn HC, Van Der Velden J, Vergote I, Zanagnolo V, et al. Sentinel nodes in vulvar cancer: Long-term follow-up of the Groningen International Study on Sentinel nodes in Vulvar cancer (GROINSS-V) i. *Gynecol Oncol.* 2016;140(1):8–14.
 70. Gadducci A, Aletti GD. Locally advanced squamous cell carcinoma of the vulva: A challenging question for gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol.* 2020;158(1):208-217.
 71. Prader S, du Bois A, Harter P, Breit E, Schneider S, Baert T, et al. Sentinel lymph node mapping with fluorescent and radioactive tracers in vulvar cancer patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2020;301(3):729–36.
 72. Van Der Steen S, Van De Nieuwenhof HPV, 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(3):520–5.
 73. Hacker NF, Barlow EL. Staging for vulvar cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2015 Aug;29(6):802-11.
 74. 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(3):643–8.
 75. Knopp S, Tropè C, Nesland JM, Holm R. A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. *J Clin Pathol.* 2009;62(3):212–8.
 76. Van Esch EMG, Van Poelgeest MIE, Kouwenberg S, Osse EM, Trimbos JBMZ, Fleuren GJ, 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.* 2015;136(4):E95–106.
 77. Kortekaas KE, Santegoets SJ, Abdulrahman Z, Van Ham VJ, Van Der Tol M, Ehsan I, et al. High numbers of activated helper T cells are associated with better clinical outcome in early stage vulvar cancer, irrespective of HPV or p53 status. *J Immunother Cancer.*

- 2019;7(1):1–13.
78. Cocks M, Chaux A, Jenson EG, Miller JA, Rodriguez Pena MDC, Tregnago AC, et al. Immune checkpoint status and tumor microenvironment in vulvar squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2020;477(1):93–102.
 79. A.C.Camargo CC. Tipos de câncer: vulva. 2018. Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/tipos-de-cancer/vulva>. [2020 out 12]
 80. Sallum L, Derchain S, Fonseca R. Câncer de vulva. *Diretrizes clínicas na Saúde Suplementar.* 2011;1–16.
 81. De Melo Ferreira AP, De Figueiredo EM, Lima RA, Cândido EB, De Castro Monteiro MV, De Figueiredo Franco TMR, et al. Quality of life in women with vulvar cancer submitted to surgical treatment: A comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;165(1):91–5.
 82. Lockhart J, Gray NM, Cruickshank ME. The development and evaluation of a questionnaire to assess the impact of vulval intraepithelial neoplasia: A questionnaire study. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2013;120(9):1133–43.
 83. Baiocchi G, Mantoan H, De Brot L, Badiglian-Filho L, Kumagai LY, Faloppa CC, et al. How important is the pathological margin distance in vulvar cancer? *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(12):1653–8.
 84. Andersen BL, Hacker NF. Psychosexual adjustment after vulvar surgery. *Obstet Gynecol.* 1983;62(4):457–62.
 85. Podratz KC, Symmonds RE, Taylor WF, Williams TJ. Carcinoma of the vulva: analysis of treatment and survival. *Obs Gynecol.* 1993;61:63-74.
 86. Van Der Zee AGJ, Oonk MH, De Hullu JA, Ansink AC, Vergote I, Verheijen RH, et al. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(6):884–9.
 87. 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.
 88. Pouwer A-FW, Arts HJ, van der Velden J, de Hullu JA. Limiting the morbidity of inguinofemoral lymphadenectomy in vulvar cancer patients; a review. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017;17(7):615–24.
 89. te Grootenhuis NC, Pouwer AFW, de Bock GH, Hollema H, Bulten J, van der Zee AGJ, et al. Prognostic factors for local recurrence of squamous cell carcinoma of the vulva: a systematic review. *Gynecol Oncol.* 2018;148(3):622–31.

90. Sykes P, Eva L, van der Griend R, McNally O, Blomfield P, Brand A, et al. Pathological process has a crucial role in sentinel node biopsy for vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2019;153(2):292–6.
91. Prieske K, Haeringer N, Grimm D, Trillsch F, Eulenburg C, Burandt E, et al. Patterns of distant metastases in vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2016;142(3):427–34.
92. van der Linden M, van Esch E, Bulten J, Dreef E, Massuger L, van der Steen S, et al. The immune cell infiltrate in the microenvironment of vulvar Paget disease. *Gynecol Oncol.* 2018;151(3):453–9.
93. Abdulrahman Z, Kortekaas KE, De Vos Van Steenwijk PJ, Van Der Burg SH, Van Poelgeest MIE. The immune microenvironment in vulvar (pre)cancer: review of literature and implications for immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(12):1223–33.
94. Lee SJ, Yang A, Wu T, Hung CF. Immunotherapy for human papillomavirus-associated. *J Gynecol Oncol.* 2016;27(5):e51.
95. Hausen H zur, Françoise B-S, Montagnier L. Nobel Prize winner “for his discovery of human papilloma viruses causing cervical cancer.” The Nobel Foundation. 2008.
96. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(12 I):3812–5.
97. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):690–8.
98. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001;92(4):805–13.
99. Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Cancer Lett.* 2002;38:227–34.
100. Santos O, Romanos V, Wigg D. *Introdução à virologia humana.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
101. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17–27.
102. Souto R, Falhari JPB, Cruz AD. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Rev Bras Cancerol.* 2005;51:155–60.
103. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl.):7.
104. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus

- capsid proteins. *J Virol.* 2002;76(19):10009–14.
105. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518–27.
 106. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32(suppl.):43–51.
 107. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24(suppl. 3):1–10.
 108. Lavorato-Rocha AM, Melo Maia B, Rodrigues IS, Stiepcich MMÁ, Baiocchi G, Cestari FMDS, et al. Prognostication of vulvar cancer based on p14arf status: molecular assessment of transcript and protein. *Ann Surg Oncol.* 2012;31–9.
 109. Palisoul ML, Mullen MM, Feldman R, Thaker PH. Identification of molecular targets in vulvar cancers. *Gynecol Oncol.* 2017 Aug;146(2):305-313.
 110. Sznurkowski JJ, Zawrocki A, Biernat W. Local immune response depends on p16INK4a status of primary tumor in vulvar squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(28):46204–10.
 111. 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.
 112. Fernandes J, Fernandes T, de Azevedo J, Cobucci R, de Carvalho M, Andrade V, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncol Lett.* 2015 Mar;9(3):1015-26.
 113. Chokoeva AA, Tchernev G, Castelli E, Orlando E, Verma SB, Grebe M, et al. Vulvar cancer: a review for dermatologists. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2015;165(7–8):164–77.
 114. Viola JPB, Teixeira LK, Werneck MBF. Imunologia tumoral. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. *Oncologia molecular.* São Paulo: Atheneu; 2004. p.105-12.
 115. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2011;140(6):883–99.
 116. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014;41(1):49–61.
 117. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
 118. Tili E, Michaille JJ, Croce CM. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions

- linking inflammation with cancer. *Immunol Rev.* 2013;253(1):167–84.
119. 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.
 120. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018;32(19–20):1267–84.
 121. Wang S, Wu P, Chen Y, Chai Y. Ambiguous roles and potential therapeutic strategies of innate lymphoid cells in different types of tumor (Review). *Oncol Lett.* 2020;20(2):1513–25.
 122. Levy J. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res.* 2006;19(1):10–6.
 123. Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res.* 2016;2016:4273943.
 124. Lima F. Relação entre status do HPV e reação inflamatória relacionada ao tumor no carcinoma da vulva e suas lesões precursoras. A.C.Camargo Cancer Center; 2015.
 125. Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, de M Maia B, Stiepcich MMA, de Carvalho FM, Baiocchi G, et al. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV. *Br J Cancer.* 2013;109(1):184–94.
 126. Nooij LS, Brand FAM, Gaarenstroom KN, Creutzberg CL, de Hullu JA, van Poelgeest MIE. Risk factors and treatment for recurrent vulvar squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;106:1–13.
 127. Butt JL, Botha MH. Vulvar cancer is not a disease of the elderly: Treatment and outcome at a tertiary referral centre in South Africa. *South African Med J.* 2017;107(11):1000.
 128. Huisman BW, Burggraaf J, Vahrmeijer AL, Schoones JW, Rissmann RA, Sier CFM, et al. Potential targets for tumor-specific imaging of vulvar squamous cell carcinoma: A systematic review of candidate biomarkers. *Gynecol Oncol.* 2020;156(3):734–43.
 129. Lanneau GS, Argenta PA, Lanneau MS, Riffenburgh RH, Gold MA, McMeekin DS, et al. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(6):645.e1-5.
 130. Gómez-Flores-ramos L, Castro-Sánchez A, Peña-Curiel O, Mohar-Betancourt A. Molecular biology in young women with breast cancer: from tumor gene Expression To DNA mutations. *Rev Investig Clin.* 2017;69(4):181–92.
 131. Hoang LN, Park KJ, Soslow R a., Murali R. Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges. *Pathology.* 2016;2(June):1–12.
 132. McAlpine JN, Kim SY, Akbari A, Eshragh S, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz

- M, et al. HPV-independent Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia (dVIN) is Associated With an Aggressive Clinical Course. *Int J Gynecol Pathol.* 2017;1.
133. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *J Am Med Assoc.* 2007;297(8):813–9.
 134. Li Y, Xu C. Human papillomavirus-related cancers. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1018:23–34.
 135. Sanjosé S de, Diaz M, Castellsagué X, Ord GC, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *J Health Manag.* 2007;7(3):453–9.
 136. Luria Cardoza-Favarato G. Human Papillomavirus. 2020 Aug 16. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–.
 137. Miyauchi S, Kim SS, Pang J, Gold KA, Gutkind JS, Califano JA, et al. HHS Public Access. 2019;25(14):4211–23.
 138. Qureshi HA, Abouyared M, Barber B, Houlton JJ. Surgical options for locally advanced oropharyngeal cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(5).
 139. Stratton KL, Culkin DJ. A Contemporary review of HPV and penile cancer. *Oncol (willist Park).* 2016;30:245–9.
 140. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24–35.
 141. Serup-Hansen E, Linnemann D, Skovrider-Ruminski W, Hgødall E, Geertsen PF, Havsteen H. Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol.* 2014;32(17):1812–7.
 142. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MPW, Berkhof J, Meijer CJLM, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer.* 2006;119(5):1078–81.
 143. Djajadiningrat RS, Jordanova ES, Kroon BK, Van Werkhoven E, De Jong J, Pronk DTM, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer and association with clinical outcome. *J Urol.* 2015;193(2):526–31.
 144. Rasmussen CL, Sand FL, Hoffmann Frederiksen M, Kaae Andersen K, Kjær SK. Does HPV status influence survival after vulvar cancer? *Int J Cancer.* 2018;142(6):1158–65.
 145. Mirghani H, Amen F, Tao Y, Deutsch E, Levy A. Increased radiosensitivity of HPV-

- positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(10):844–52.
146. Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. *Open Virol J.* 2012;6:241–8.
 147. Toh B, Chew V, Dai X, Khoo K, Tham M, Wai LE, et al. Immune predictors of cancer progression. *Immunol Res.* 2012;53(1–3):229–34.
 148. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;1–14.
 149. Coventry B, Heinzl S. CD1a in human cancers: a new role for an old molecule. *Trends Immunol.* 2004;25(5):242–8.
 150. de Miranda NFCC, Björkman A, Pan-Hammarström Q. DNA repair: The link between primary immunodeficiency and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1246(1):50–63.
 151. Quail D, Joyce J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423–37.
 152. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–99.
 153. Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell.* 2004;118(6):671–4.
 154. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007;19(2):203–8.
 155. Nicolini A, Ferrari P, Rossi G, Carpi A. Tumour growth and immune evasion as targets for a new strategy in advanced cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(11).
 156. Whiteside A. Poverty and HIV/AIDS in Africa. *Third World Q.* 2002;23(2):313–32.
 157. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and Cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860–7.
 158. 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.* 2015;136(4):E85–94.
 159. Zhou L, Li Y, Gao W, Huangfu H, Wen S, Zhang C, et al. Assessment of tumor-associated immune cells in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(7):1761–72.
 160. Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, et al. Prognostic impact of peritumoral lymphocyte infiltration in soft tissue sarcomas. *BMC Clin Pathol.* 2012;12(1):5.
 161. Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Kroemer G. Prognostic

- and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 2011;71(17):5601–5.
162. Sahin Ozkan H, Ugurlu MU, Yumuk PF, Kaya H. Prognostic role of immune markers in triple negative breast carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(4):2733–45.
 163. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711–23.
 164. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2517–26.
 165. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):e542–51.
 166. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 2018;50(12):1–11.
 167. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-squamous Non- small Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627–39.
 168. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2018–28.
 169. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(13):23–34.
 170. Polk A, Svane IM, Andersson M, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in breast cancer – Current status. *Cancer Treat Rev.* 2018;63:122–34.
 171. Cheng W, Fu D, Xu F, Zhang Z. Unwrapping the genomic characteristics of urothelial bladder cancer and successes with immune checkpoint blockade therapy. *Oncogenesis.* 2018;7(1).
 172. Perez L, Shurin MR, Collins B, Kogan D, Tourkova IL, Shurin G V. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol.* 2005;20(4):1165–72.
 173. Upadhyay RB, Upadhyay J, Rao NN, Agrawal P. The role of Langerhans cells in oral squamous cell carcinoma. *Chinese-German J Clin Oncol.* 2011;10(10):606–11.
 174. Jardim JF, Gondak R, Galvis MM, Pinto CAL, Kowalski LP. A decreased peritumoral

- CD1a⁺ cell number predicts a worse prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2018;72(6):905–13.
175. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2003;104(1):92–7.
 176. Hu M, Li K, Maskey N, Xu Z, Peng C, Wang B, et al. Decreased intratumoral Foxp3 Tregs and increased dendritic cell density by neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):4685–94.
 177. Dallal RM, Christakos P, Lee K, Egawa S, Son YI, Lotze MT. Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer. *Surgery*. 2002;131(2):135–8.
 178. Yilmaz T, Gedikoglu G, Celik A, Onerci M, Turan E. Prognostic significance of Langerhans cell infiltration in cancer of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132:309–16.
 179. Proietti A, Ugolini C, Melillo RM, Crisman G, Elisei R, Santoro M, et al. Higher Intratumoral Expression of CD1a, Tryptase, and CD68 in a follicular variant of papillary thyroid carcinoma compared to adenomas: correlation with clinical and pathological parameters. *Thyroid*. 2011;21(11):1209–15.
 180. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, Mchugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in. *Head Neck*. 2016;38(7):1074–84.
 181. Rotsztein H, Trznadel-Budźko E, Jesionek-Kupnicka D. Do Langerhans cells play a role in vulvar epithelium resistance to squamous cell carcinoma? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55(2):127–30.
 182. Rosales R. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers. *World J Clin Oncol*. 2014;5(5):1002.
 183. Mosconi C, de Arruda JAA, de Faria ACR, Oliveira GAQ, de Paula HM, Fonseca FP, et al. Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Oral Oncol*. 2019;88(August 2018):95–101.
 184. Mosconi C, de Arruda JAA, de Faria ACR, Oliveira GAQ, de Paula HM, Fonseca FP, et al. Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Oral Oncol*. 2019 Jan;88:95-101.
 185. Sheu BC, Chiou SH, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Ho HN, et al. Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8 + T lymphocytes in human cervical carcinoma.

- Cancer Res. 2005;65(7):2921–9.
186. Sznurkowski JJ, Żawrocki A, Biernat W. Subtypes of cytotoxic lymphocytes and natural killer cells infiltrating cancer nests correlate with prognosis in patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(3):297–303.
 187. Xu L, Chen D, Lu CC, Liu X, Wu G, Zhang Y. Advanced lung cancer is associated with decreased expression of perforin, CD95, CD38 by circulating CD3+CD8+ T lymphocytes. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45(5):528–32.
 188. Jochems C, Schlom J. Between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011 May 1;236(5):567-79.
 189. Diaconescu DE, Dima L, Marinescu DM, Țânțu MM, Rogozea LM. S100-positive dendritic cells in squamous cell laryngeal cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(4):1371–5.
 190. Gomes JO, de Vasconcelos Carvalho M, Fonseca FP, Gondak RO, Lopes MA, Vargas PA. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(6):433–9.
 191. Amoueian S, Attaranzadeh A, Montazer M. Intratumoral CD68-, CD117-, CD56-, and CD1a-positive immune cells and the survival of iranian patients with non-metastatic intestinal-type gastric carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2015;211(4):326–31.
 192. Gulubova M V., Ananiev JR, Vlaykova TI, Yovchev Y, Tsoneva V, Manolova IM. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27(2):159–69.
 193. Ambe K, Mori M, Enjoji M, Cells GOF. S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. *Cancer.* 1989;12(Dec):496–503.
 194. Bai Y, Li L-D, Li J, Lu X. Prognostic values of S100 family members in ovarian cancer patients. *BMC Cancer.* 2018;18:1256.
 195. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(2):96–109.
 196. Zhang S, Wang Z, Liu W, Lei R, Shan J, Li L, et al. Distinct prognostic values of S100 mRNA expression in breast cancer. *Sci Rep.* 2017;7(January):1–11.
 197. Allgöwer C, Kretz AL, von Karstedt S, Wittau M, Henne-Bruns D, Lemke J. Friend or Foe: S100 proteins in cancer. *Cancers (Basel).* 2020 Jul 24;12(8):2037.
 198. Lee YJ, Kang SY, Jo MS, Suh DS, Kim KH, Yoon MS. S100 expression in dendritic cells is inversely correlated with tumor grade in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol Sci.* 2014;57(3):201.

199. Coppola D, Fu L, Nicosia S V, Kounelis S, Jones M. Prognostic significance of p53, bcl-2, vimentin, and S100 protein- positive langerhans cells in endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 1998;29(5):455–62.
200. Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Nagashima N, Onitsuka K, et al. Relationships between S-100 protein-positive cells and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2003;23(6 A):4423–6.
201. Furukawa T, Watanabe S, Kodama T, Sato Y, Shimosato Y, Suemasu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer.* 1985;56(11):2651–6.
202. Matsuda H, Mori M, Tsujitani S, Ohno S, Kuwano H, Sugimachi K. Immunohistochemical evaluation. *Cancer.* 1990;65:2261–5.
203. Honig A, Schaller N, Dietl J, Backe J, Kammerer U. S100 as an immunohistochemically-detected marker with prognostic significance in endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 2005;25(3 A):1747–53.
204. Yen MC, Huang YC, Kan JY, Kuo PL, Hou MF, Hsu YL. S100B expression in breast cancer as a predictive marker for cancer metastasis. *Int J Oncol.* 2018;52(2):433–40.
205. Mu S, Ma H, Shi J, Zhen D. The expression of S100B protein in serum of patients with brain metastases from small-cell lung cancer and its clinical significance. *Oncol Lett.* 2017;14(6):7107–10.
206. Chen L, Hu X, Wu H, Jia Y, Liu J, Mu X, et al. Over-expression of S100B protein as a serum marker of brain metastasis in non-small cell lung cancer and its prognostic value. *Pathol Res Pract.* 2019;215(3):427–32.
207. Harpio R, Einarsson R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem.* 2004;37(7):512–8.
208. Schiltz PM, Dillman RO, Korse CM, Cubellis JM, Lee GJ, Gast GC De. Lack of elevation of serum S100B in patients with metastatic melanoma as a predictor of outcome after induction with an autologous vaccine of proliferating tumor cells and dendritic cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008;23:214–21.
209. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull.* 1995;37(4):417–29.
210. Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(4):134–40.
211. Holthoff ER, Jeffus SK, Gehlot A, Stone R, Erickson SW, Kelly T, et al. Perineural invasion is an independent pathologic indicator of recurrence in vulvar squamous cell

- carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015 Aug;39(8):1070-4.
212. Liu Y, Cui J, Tang YL, Huang L, Zhou CY, Xu JX. Prognostic Roles of mRNA Expression of S100 in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
 213. Hwang CC, Chai HT, Chen HW, Tsai HL, Lu CY, Yu FJ, et al. S100B protein expressions as an independent predictor of early relapse in UICC stages II and III colon cancer patients after curative resection. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(1):139–45.
 214. Kruijff S, Hoekstra HJ. The current status of S-100B as a biomarker in melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38(4):281–5.
 215. Frauchiger AL, Dummer R, Mangana J. Serum S100B levels in melanoma. *Methods Mol Biol*. 2019;1929:691–700.
 216. Maletzki C, Bodammer P, Breitrück A, Kerkhoff C. S100 proteins as diagnostic and prognostic markers in colorectal and hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon*. 2012;12(10 HCC).
 217. La Rocca G, Anzalone R, Bucchieri F, Farina F, Cappello F, Zummo G. CD1a and antitumour immune response. *Immunol Lett*. 2004;95(1):1–4.
 218. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1865–74.
 219. Pinzon-Charry A, Maxwell T, López JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(5):451–61.
 220. Chen S-H, Zhang B-Y, Zhou B, Zhu C-Z, Sun L-Q, Feng Y-J. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *Am J Cancer Res*. 2019;9(1):1–21.
 221. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009;115(15):3379–91.
 222. Heaps JM, Fu YS, Montz FJ, Hacker NF, Berek JS. Surgical-pathologic variables predictive of local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol*. 1990;38(3):309–14.
 223. Vorbeck CS, Vogelius IR, Banner-Voigt MLVC, Mathiesen HF, Mirza MR. Survival and failure types after radiation therapy of vulvar cancer. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2017;5:20–7.
 224. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Rappa F, Marasà S, et al. CD1a down-regulation in primary invasive ductal breast carcinoma may predict regional lymph node invasion and patient outcome. *Histopathology*. 2008;52(2):203–12.

225. Golmoghaddam H, Pezeshki AM, Ghaderi A, Doroudchi M. CD1a and CD1d genes polymorphisms in breast, colorectal and lung cancers. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(3):669–75.
226. Hilly O, Rath-Wolfson L, Koren R, Mizrachi A, Hamzany Y, Bachar G, et al. CD1a-positive dendritic cell density predicts disease-free survival in papillary thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2015;211(9):652–6.
227. Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg.* 1998;124(6):641–6.
228. Ni YH, Zhang X xin, Lu Z yi, Huang XF, Wang ZY, Yang Y, et al. Tumor-infiltrating CD1a+ DCs and CD8+/FoxP3+ ratios served as predictors for clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma patients. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(3):1687–95.
229. Coventry BJ, Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *Br J Cancer.* 2003;89(3):533–8.
230. Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJM, Offringa R, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2576–82.
231. Kindt N, Descamps G, Seminerio I, Bellier J, Lechien JR, Pottier C, et al. Langerhans cell number is a strong and independent prognostic factor for head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2016;62:1–10.
232. Jiao Q, Liu C, Li W, Li W, Fang F, Qian Q, et al. Programmed death-1 ligands 1 and 2 expression in cutaneous squamous cell carcinoma and their relationship with tumour-infiltrating dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2017;188(3):420–9.
233. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: Structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.* 2010;235(1):35–54.
234. Souza BMB, De Vito FB, Calado ML, Silva MV, Oliveira LR, Rodrigues-Júnior V, et al. Evaluation of the cytotoxic response mediated by perforin and granzyme B in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2018;59(1):214–20.
235. Willenbring RC, Johnson AJ. Finding a balance between protection and pathology: the dual role of perforin in human disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1–18.
236. Spicer BA, Conroy PJ, Law RHP, Voskoboinik I, Whisstock JC. Perforin-a key (shaped) weapon in the immunological arsenal. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;72:117–23.
237. Kontani K, Sawai S, Hanaoka J, Tezuka N, Inoue S, Fujino S. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers.

- Eur J Surg Oncol. 2001;27(2):180–6.
238. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633–40.
 239. Wagner AK, Alici E, Lowdell MW. Characterization of human natural killer cells for therapeutic use. *Cytotherapy.* 2019;21(3):315–26.
 240. de Jonge K, Ebering A, Nassiri S, Maby-El Hajjami H, Ouertatani-Sakouhi H, Baumgaertner P, et al. Circulating CD56 bright NK cells inversely correlate with survival of melanoma patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10.
 241. Alegretti AP, Bittar CM, Bittencourt R, Piccoli AK, Schneider L, Silla LM, et al. The expression of CD56 antigen is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33(3):202–6.
 242. Bösmüller HC, Wagner P, Pham DL, Fischer AK, Greif K, Beschorner C, et al. CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule) expression in ovarian carcinomas: association with high-grade and advanced stage but not with neuroendocrine differentiation. *Int J Gynecol Cancer.* 2017;27(2):239–45.
 243. Wagner S, Wittekindt C, Reuschenbach M, Hennig B, Thevarajah M, Würdemann N, et al. CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2016;138(9):2263–73.
 244. Hamanishi J, Konishi I. Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint signal - a new treatment strategy for cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2014;41:1071–6.
 245. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: Predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57):97671–82.
 246. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(3):727–42.
 247. Andreu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, et al. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell.* 2010;17(2):121–34.
 248. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
 249. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell.* 2015;16(3):225–38.
 250. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through

- suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol.* 2011;28(3):682–8.
251. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: Next-generation immunotherapy-inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res.* 2012;18(24):6580–7.
252. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):1–22.
253. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Brandon S, Wang H, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(1):54–63.
254. Song M, Chen D, Lu B, Wang C, Zhang J, Huang L, et al. PTEN Loss Increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS One.* 2013;8(6):e65821.
255. D’Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 2015;112(1):95–102.
256. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, Kotoula V, Rampias T, Chatzopoulos K, et al. Evaluation of PD-L1 expression and associated tumor-infiltrating lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(3):704–13.
257. Hecking T, Thiesler T, Schiller C, Lunkenheimer J, Ayub TH, Rohr A, et al. Tumoral PD-L1 expression defines a subgroup of poor-prognosis vulvar carcinomas with non-viral etiology. *Oncotarget.* 2017;8(54):92890–903.
258. Sznurkowski JJ, Żawrocki A, Sznurkowska K, Pęksa R. PD-L1 expression on immune cells is a favorable prognostic factor for vulvar squamous cell carcinoma patients. 2017;8(52):89903–12.
259. Kim HR, Ha SJ, Hong MH, Heo SJ, Koh YW, Choi EC, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6(November):1–12.
260. Takahashi H, Sakakura K, Arisaka Y, Tokue A, Kaira K, Tada H, et al. Clinical and biological significance of PD-L1 expression within the tumor microenvironment of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2019;39:3039–46.
261. Roper E, Lum T, Palme CE, Ashford B, Ch’ng S, Ranson M, et al. PD-L1 expression

- predicts longer disease free survival in high risk head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2017;49(5):499–505.
262. Xu J, Wang F, Yan Y, Zhang Y, Du Y, Sun G. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 in melanoma: a meta-analysis. *Am J Med Sci*. 2020;359(6):339–46.
 263. Hu C, Tian S, Lin L, Zhang J, Ding H. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2020;102(November 2019):104560.
 264. Wang X, Liu Y. PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2020;216(3):1–5.
 265. Tsuruchi N, Kaku T, Kamura T, Tsukamoto N, Tsuneyoshi M, Akazawa K, et al. The prognostic significance of lymphovascular space invasion in endometrial cancer when conventional hemotoxylin and eosin staining is compared to immunohistochemical staining. *Gynecol Oncol*. 1995;57:307–312.
 266. Hachisuga T, Kaku T, Fukuda K, Eguchi F, Emoto M, Kamura T, et al. The grading of lymphovascular space invasion in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1999;86(10):2090–7.
 267. O'Brien DJ, Flannelly G, Mooney EE, Foley M. Lymphovascular space involvement in early stage well-differentiated endometrial cancer is associated with increased mortality. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2009;116(7):991–4.
 268. Watanabe Y, Satou T, Nakai H, Etoh T, Dote K, Fujinami N, et al. Evaluation of parametrial spread in. *Obstet Gynecol*. 2010;116(5):1027–34.
 269. Guntupalli SR, Zigelboim I, Kizer NT, Zhang Q, Powell MA, Thaker PH, et al. Lymphovascular space invasion is an independent risk factor for nodal disease and poor outcomes in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;124(1):31–5.
 270. Ortoft G, Lausten-Thomsen L, Høgdall C, Hansen ES, Dueholm M. Lymph-vascular space invasion (LVSI) as a strong and independent predictor for non-locoregional recurrences in endometrial cancer: a danish gynecological cancer group study. *J Gynecol Oncol*. 2019;30(5):1–14.
 271. Roman LD, Felix JC, Muderspach LI, Varkey T, Burnett AF, Qian D, et al. Influence of quantity of lymph vascular space invasion on time to recurrence in women with early-stage squamous cancer of the cervix. *Gynecol Oncol*. 1998;68:288–93.
 272. Sakuragi N, Takeda N, Hareyama H, Fujimoto T, Todo Y, Okamoto K, et al. A multivariate analysis of blood vessel and lymph vessel invasion as predictors of ovarian and lymph node metastases in patients with cervical carcinoma. *Cancer*. 2000;88:2578–83.

273. Memarzadeh S, Natarajan S, Dandade DP, Ostrzega N, Saber PA, Busuttil A, et al. Lymphovascular and perineural invasion in the parametria: A prognostic factor for early-stage cervical cancer. *Obstet Gynecol.* 2003;102(3):612–9.
274. Morice P, Piovesan P, Rey A, Atallah D, Haie-Meder C, Pautier P, et al. Prognostic value of lymphovascular space invasion determined with hematoxylin-eosin staining in early stage cervical carcinoma: Results of a multivariate analysis. *Ann Oncol.* 2003;14(10):1511–7.
275. Chernofsky MR, Felix JC, Muderspach LI, Morrow CP, Ye W, Groshen SG, et al. Influence of quantity of lymph vascular space invasion on time to recurrence in women with early-stage squamous cancer of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2006;100(2):288–93.
276. Lim CS, Alexander-Sefre F, Allam M, Singh N, Aleong JC, Al-Rawi H, et al. Clinical value of immunohistochemically detected lymphovascular space invasion in early stage cervical carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(9):2581–8.
277. Matsuo K, Sheridan TB, Yoshino K, Miyake T, Hew KE, Im DD, et al. Significance of lymphovascular space invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Med.* 2012;1(2):156–64.
278. Raspagliesi F, Hanozet F, Ditto A, Solima E, Zanaboni F, Vecchione F, et al. Clinical and pathological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2006;102(2):333–7.
279. Rouzier R, Preti M, Haddad B, Martin M, Micheletti L, Paniel BJ. Development and validation of a nomogram for predicting outcome of patients with vulvar cancer. *Obstet Gynecol.* 2006;107(3):672–7.
280. Cheng X, Zang R, Wu X, Li Z, Cai S, Zhang Z. Recurrence patterns and prognostic factors in chinese patients with squamous cell carcinoma of the vulva treated with primary surgery. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(1):158–62.
281. Long Y, Yao DS, Wei YS, Wei CH, Chen XY. Prognostic significance of perineural invasion in vulvar squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:4461–9.
282. Tang M, Liu Q, Yang X, Chen L, Yu J, Qi X, et al. Perineural invasion as a prognostic risk factor in patients with early cervical cancer. *Oncol Lett.* 2019;17(1):1101–7.
283. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA, Perineural C. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(March):354–9.
284. Zhu J, Zhou R, Wang Y, Yu M. Perineural invasion as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Acta Otolaryngol.*

- 2019;139:1038–43.
285. Park J, Megow A, Swalling A, Hodge JC, Foreman A, Boase S, et al. Prognosis of oral squamous cell carcinoma with perineural invasion: a comparative study of classification types. *Clin Otolaryngol.* 2020;45(1):99–105.
 286. Carter JB, Johnson MM, Chua TL, Karia PS, Schmults CD. Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion an 11-year cohort study. *JAMA Dermatology.* 2013;149(1):35–42.
 287. Lubig S, Thiesler T, Müller S, Vorreuther R, Leipner N, Kristiansen G. Quantitative perineural invasion is a prognostic marker in prostate cancer. *Pathology.* 2018;50(3):298–304.
 288. Furuhashi S, Sakaguchi T, Murakami T, Fukushima M, Morita Y, Ikegami K, et al. Tenascin C in the tumor-nerve microenvironment enhances perineural invasion and correlates with locoregional recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* 2020;49(3):442–54.
 289. Zhao B, Lv W, Mei D, Luo R, Bao S, Huang B, et al. Perineural invasion as a predictive factor for survival outcome in gastric cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol.* 2020;73:544–51.
 290. Kim S, Huh JW, Lee WY, Yun SH, Kim HC, Cho YB, et al. Lymphovascular invasion, perineural invasion, and tumor budding are prognostic factors for stage I colon cancer recurrence. *Int J Colorectal Dis.* 2020;35(5):881–5.
 291. Gadducci A, Pistolesi S, Cosio S, Naccarato AG. Is Perineural Invasion a Novel Prognostic Factor Useful to Tailor Adjuvant Treatment in Patients Treated With Primary Surgery for Cervical and Vulvar Carcinoma? *Anticancer Res.* 2020 Jun;40(6):3031-7.
 292. Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977;78:1–30.

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



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 05/04/2016, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 16/02/2016, aprovaram a realização do projeto nº 2161/16 intitulado: “Relação entre perfil de expressão dos mi-RNAs, status do HPV e reação inflamatória associada ao tumor no carcinoma invasivo da vulva”.

Pesquisador responsável: Dr. José Vassallo
Aluna: Flávia Lopes de Lima (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 11 de abril de 2016.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gróss
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

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

NEOPLASIAS EPITELIAIS
Carcinomas escamosos e lesões precursoras
<i>Carcinoma escamoso, sem outra especificação</i>
Queratinizante
Não-queratinizante
Basalóide
Condilomatoso (<i>warty</i>)
Verrucoso
Queratoacantoma- <i>like</i>
Variante com células gigantes
Outros
<i>Carcinoma basocelular</i>
<i>Neoplasia intraepitelial escamosa</i>
Neoplasia intraepitelial vulvar (VIN3)/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, Lion, 2014.

Anexo 3 - Estadiamento International Federation of Gynecology and Obstetrics-FIGO (2009) para o carcinoma de vulva

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

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 4 - 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; freqüente desmoplasia
Imunohistoquímica para proteína p16 e p14	Positiva	Negativa
Imunohistoquímica para MIB1 (Ki67)	Expressão alta	Expressão baixa
Vias patogênicas	<i>Via do HPV</i>	<i>Via TP53</i>
Mecanismos patogênicos	Infeção 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
CD56	Células NK	Membrana
CD68	Histiócitos	Citoplasma
Granzima B	Células citotóxicas	Citoplasma
Perforina	Células citotóxicas	Citoplasma
S100	Células de Schwann	Citoplasma/N
CD1a	Células de Langerhans	Membrana
PDL-1	Células Linfóides B	Membrana