

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE  
MARCADORES DA VIA WNT EM CARCINOMA  
DE VULVA HPV POSITIVO E NEGATIVO**

**RODRIGO BARROS CRESPO**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**Co-Orientadora: Dra Marcilei E. C. Buim**

**Co-Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha**

**São Paulo**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Crespo, Rodrigo Barros

**Análise da expressão proteica de marcadores da via WNT em carcinoma de vulva HPV positivo e negativo** / Rodrigo Barros Crespo – São Paulo, 2012.

97p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. NEOPLASIAS VULVARES. 2. DOENÇAS DOS GENITAIS FEMININOS. 3. PROTEÍNAS WNT. 4. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 5. PAPILOMAVIRUS HUMANO 16. 6. PAPILOMAVIRUS HUMANO 18.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho em suma à minha mãe Elizete Barros Crespo que sempre foi a maior motivadora de tudo que faço.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me acolhido e dado forças em todos os momentos difíceis da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Fernando que sempre foi um referencial de conduta, profissionalismo, competência e sabedoria, o qual me fundamentou na pesquisa e na vida pessoal sempre me acolhendo com palavras paternas quando eu precisava e enérgicas quando necessário.

A minha co-orientadora Dra. Marcilei que se fez amiga e sempre presente em todos os momentos me direcionando em tudo que eu precisava.

Ao meu co-orientador Dr. Rafael por toda disponibilidade e ajuda a mim dada.

A minha sempre presente anjo da guarda Luciana Lemos e não tenho palavras para descrever sua importância em minha vida.

A uma amiga em especial Alice que foi uma irmã para mim estando sempre ao meu lado.

A todo grupo de pesquisa do CIPE, SAME, Biblioteca e Pós-graduação que forma uma das melhores equipes multidisciplinar do Brasil.

## RESUMO

Crespo RB. **Análise da expressão protéica de marcadores da via WNT em carcinoma de vulva com HPV positivo e negativo.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma vulvar é uma neoplasia ginecológica rara, representando aproximadamente 3-5% dos tumores genitais femininos e 1% dos cânceres na mulher. O carcinoma epidermóide usual e suas variantes representam mais do que 90% dos casos. Na última década, intensificou-se o estudo deste tumor devido o aumento da incidência da doença, além de serem limitados os conhecimentos existentes das alterações moleculares neste tipo de tumor. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão das proteínas da via do WNT (Wnt1, Wnt2, Frizzled1,  $\beta$ -Catenina, Gsk3 $\beta$ , Ciclina D1, CD44, CMYC) em carcinoma epidermóide vulvar e sua associação com o prognóstico, através da técnica de imunohistoquímica e ainda, correlacionar as possíveis alterações na via Wnt com a presença ou ausência de HPV. **MÉTODOS:** Cento e vinte casos de carcinoma epidermóide vulvar foram selecionados dos arquivos do Hospital A. C. Camargo. As lâminas e blocos originais foram re-avaliados, re-classificados e selecionadas as áreas tumorais para a construção dos microarranjos de tecido (TMAs). Foram avaliadas a expressão das proteínas da via do WNT através de técnicas de imunohistoquímica e analisadas pelo sistema automatizado de imagem, Aperio. Foi extraído DNA dos casos parafinados, amplificado via PCR e tipado o HPV através do kit Linear Array HPV (Roche). **RESULTADOS:** Foram observados os seguintes aspectos: (1) Aumento da frequência do carcinoma de vulva com o aumento da idade; (2) Predominância de pacientes da raça branca em relação a não-branca; (3) Baixo nível educacional como um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença; (4) Positividade de HPV em cerca de 40% das amostras é semelhante ao citado na literatura; (5) A avaliação dos marcadores da via

WNT demonstrou que o HPV parece não interferir nesta via.

**CONCLUSÕES:** Em carcinomas de vulva, a presença do HPV parece não interferir na imuno expressão dos marcadores da via do WNT avaliados neste estudo, ainda observamos que a via do WNT parece estar ativa porém não alterada não podendo então associa-la ao prognóstico.

## SUMMARY

Crespo RB. **[Protein expression analysis of markers from WNT pathway in HPV positive and negative vulvar carcinomas]**. São Paulo; 2012 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**BACKGROUND:** Vulvar carcinoma is a rare gynaecological tumor, representing around 3-5% of female genital tumors and 1% of cancers in women. It is more commonly found as epidermoid carcinoma, which represents 90% of vulvar tumors. In the last decade, the study of this tumor has been intensified due to the increase in incidence. Besides that, knowledge on the molecular alterations in vulvar carcinoma is poor. **GOALS:** Evaluate immunohistochemistry expression of proteins from WNT pathway (Wnt1, Wnt2, Frizzled1,  $\beta$ -Catenin, Gsk3 $\beta$ , Ciclin D1, CD44, and CMYC) in vulvar epidermoid carcinoma and its association with prognostic, and also correlate possible alterations in WNT pathway with HPV infection. **METHODS:** One hundred and twenty samples of vulvar epidermoid carcinoma were selected from the files of A. C. Camargo Hospital. Original HE slides and blocks were re-evaluated and re-classified, and tumoral areas were selected for the construction of tissue microarrays (TMAs). Expression of WNT pathway proteins was evaluated using immunohistochemistry technique, and slides were analyzed through the automated image system Aperio. DNA was extracted from the samples in paraffin blocks and amplified using PCR technique. HPV subtype was identified using Linear Array HPV Kit (Roche). **RESULTS:** The following aspects were observed: (1). Increase of incidence of vulvar carcinoma as age increases; (2). Predominance of white patients compared to non-whites; (3). Low educational level as an important risk for the disease development; (4). Positivity for HPV in around 40% of samples is similar to literature reports; (5) Evaluation of WNT markers have demonstrated that HPV does not interfere in this pathway. **CONCLUSIONS:** In vulvar carcinomas, presence of HPV does not seem to interfere in the

immunoexpression of WNT pathway markers evaluated in the present study. Moreover, we observe that WNT pathway seems to be active but it is not altered, and therefore it cannot be associated to prognosis.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estatos da via de sinalização WNT.....	20
<b>Figura 2</b>	Guia de referência do teste de genotipagem LINEAR ARRAY HPV (Roche).....	32
<b>Figura 3</b>	Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma de vulva por faixa etária.....	35
<b>Figura 4</b>	Distribuição dos sintomas mais comumente relatados pelas pacientes com carcinoma de vulva .....	38
<b>Figura 5</b>	Curvas de sobrevida global em 5 anos em relação aos diferentes tipos histológicos dos tumores de vulva .....	42
<b>Figura 6</b>	Lâminas de H&E evidenciando os diferentes tipos histológicos de CEC de vulva.....	42
<b>Figura 7</b>	Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação à metástase linfonodal .....	44
<b>Figura 8</b>	Distribuição dos tumores do estudo em relação à localização.....	44
<b>Figura 9</b>	Distribuição dos tumores em relação ao estadiamento FIGO.....	45
<b>Figura 10</b>	Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação aos estadiamentos tumorais dentre as pacientes com carcinoma de vulva .....	46
<b>Figura 11</b>	Sobrevida global das pacientes em relação à recidiva do tumor.....	47

<b>Figura 12</b>	Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença das pacientes com carcinoma de vulva .....	48
<b>Figura 13</b>	Imunoistoquímica para Wnt1 em carcinomas vulvares.....	49
<b>Figura 14</b>	Imunoistoquímica para Wnt2 em carcinomas vulvares.....	51
<b>Figura 15</b>	Imunoistoquímica para Frizzled1 em carcinomas vulvares.....	53
<b>Figura 16</b>	Imunoistoquímica para GSK3 $\beta$ fosforilado e GSK3 $\beta$ não fosforilado em carcinomas vulvares.....	55
<b>Figura 17</b>	Imunoistoquímica para $\beta$ -catenina em carcinomas vulvares.....	58
<b>Figura 18</b>	Imunoistoquímica para Ciclina D1 em carcinomas vulvares.....	60
<b>Figura 19</b>	Imunoistoquímica para CD44 em carcinomas vulvares.....	62
<b>Figura 20</b>	Imunoistoquímica para CMYC em carcinomas vulvares.....	64
<b>Figura 21</b>	Curvas de sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para a presença de HPV entre os tumores.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação das Neoplasias Intraepiteliais Vulvares (VINs)....	6
<b>Tabela 2</b>	Tipos Histológicos de neoplasia Vulvar.....	10
<b>Tabela 3</b>	Anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica.....	28
<b>Tabela 4</b>	Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar submetidas à ressecção cirúrgica segundo idade, raça, estado civil e escolaridade (São Paulo, 2011).....	36
<b>Tabela 5</b>	Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar quanto aos dados clínicos (São Paulo, 2011).....	39
<b>Tabela 6</b>	Distribuição das amostras em relação às características anátomo-patológicas dos tumores (São Paulo, 2011).....	41
<b>Tabela 7</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Wnt1 em CEC vulvar.....	50
<b>Tabela 8</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Wnt2 em CEC vulvar.....	52
<b>Tabela 9</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Frizzled1 em CEC vulvar.....	54
<b>Tabela 10</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Gsk3 $\beta$ fosforilada e não fosforilada em CEC vulvar.....	56

<b>Tabela 11</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína $\beta$ -Catenina no citoplasma e no núcleo de CEC vulvar.....	59
<b>Tabela 12</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína CiclinaD1 em CEC vulvar.....	61
<b>Tabela 13</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína CD44 em CEC vulvar.....	63
<b>Tabela 14</b>	Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão citoplasmática e nuclear da proteína CMYC em CEC vulvar....	65
<b>Tabela 15</b>	Genotipagem de HPVs em carcinomas vulvares e tipos infectantes.....	66
<b>Tabela 16</b>	Distinção entre quantidade de tipos de HPVs infectantes em carcinomas vulvares.....	67
<b>Tabela 17</b>	Distribuição dos dados epidemiológicos das pacientes em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas vulvares.....	70
<b>Tabela 18</b>	Distribuição das variáveis anátomo-patológicas e clínicas em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas vulvares.....	71
<b>Tabela 19</b>	Distribuição da expressão imunoistoquímica dos marcadores da via WNT em relação à positividade do HPV em carcinomas vulvares.....	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>A.C.Camargo</b>	Antônio Cândido Camargo
<b>CEC</b>	carcinoma de células escamosas
<b>CEV</b>	carcinoma escamoso vulvar
<b>DAB</b>	diaminobenzidina
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>E5, E6, E7</b>	proteínas precoces do HPV
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>HPV</b>	vírus do papiloma humano
<b>H&amp;E</b>	hematoxilina e eosina
<b>IARC</b>	Agência Internacional de Pesquisas em Câncer
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>ISGYP</b>	Sociedade Internacional de Patologia Ginecológica
<b>ISSVD</b>	Sociedade Internacional para o Estudo de Doenças Vulvo Vaginais
<b>IIQ</b>	imunoistoquímica
<b>IL2</b>	interleucina 2
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>MAPK</b>	proteína cinase ativada por mitógeno
<b>n</b>	número de pacientes
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NLS</b>	sinal de localização nuclear
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p</b>	nível de significância
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PDGFR</b>	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>RR</b>	risco relativo
<b>SAME</b>	Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos
<b>SCC</b>	carcinoma de células escamosas
<b>SCF</b>	fator de célula tronco

<b>SSC</b>	tampão citrato de sódio
<b>TK</b>	tirosina cinase
<b>TMA</b>	microarranjo de tecidos
<b>TNM</b>	Tumor, Linfonodos e Metástases
<b>UICC</b>	União Internacional contra o câncer
<b>VIN</b>	neoplasia intra-epitelial vulvar

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Anatomia e histologia da vulva .....	1
1.2	Etiologia do Carcinoma Vulvar .....	3
1.3	Fatores de risco .....	4
1.4	Neoplasias Intraepiteliais Vulvares (VINs).....	5
1.4.1	Vírus do Papiloma Humano (HPV) .....	7
1.4.2	Outros fatores de risco .....	8
1.5	Tipos Histológicos .....	10
1.6	Sinais e sintomas .....	13
1.7	Diagnóstico .....	14
1.8	Estádio da doença .....	14
1.9	Padrões de disseminação do carcinoma vulvar .....	15
1.10	Prognóstico.....	16
1.11	Tratamento .....	17
1.12	Via de sinalização do WNT.....	18
1.12.1	Alterações na via de sinalização do WNT e carcinogênese .....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1	Objetivo geral .....	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1	Pacientes e espécimes anatomopatológicos.....	25
3.2	Coleta de dados clínicos.....	25
3.3	Construção dos microarranjos de tecido (TMAs).....	26
3.4	A imunistoquímica (IIQ) .....	26
3.5	Avaliação imunistoquímica .....	29
3.6	Genotipagem de HPV .....	30
3.6.1	Extração do DNA genômico de tecidos parafinados .....	30
3.6.2	Amplificação por PCR .....	31

3.6.3	Hibridação / Detecção dos Subtipos de HPV .....	31
3.7	A análise estatística.....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	Caracterização das Amostras do Estudo.....	34
4.1.1	Dados Demográficos .....	34
4.1.2	Dados clínicos das pacientes .....	36
4.2	Caracterização Clínica e Anátomo-Patológica das Amostras.....	40
4.3	Avaliação de Marcadores da via WNT em Carcinomas Vulvares.....	49
4.3.1	Imunoistoquímica .....	49
4.3.2	Wnt1 .....	49
4.3.3	Wnt2 .....	51
4.3.4	Frizzled1 .....	52
4.3.5	Gsk3 $\beta$ fosforilada e não fosforilada .....	54
4.3.6	B-Catenina.....	57
4.3.7	CiclinaD1 .....	60
4.3.8	CD44 .....	61
4.3.9	CMYC .....	63
4.4	Genotipagem de HPV.....	66
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
5.1	Aspectos epidemiológicos da casuística do estudo.....	74
5.2	Aspectos anátomo-patológicos e clínicos das pacientes.....	77
5.3	Infecção por HPV .....	83
5.4	Avaliação das proteínas da via do WNT.....	84
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA VULVA

A vulva é a parte externa do órgão genital feminino, sendo constituída pelos monte púbico, pequenos e grandes lábios, clitóris, além da abertura da uretra e pequenas glândulas que se abrem no vestíbulo - espaço correspondente à abertura externa da vagina, incluído pelos pequenos lábios (FRISTACHI 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004), sendo provida de abundante vascularizações e inervações (FONSECA-MOUTINHO 2008).

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

Os grandes lábios são dobras da pele composta por tecido adiposo e uma fina camada de músculo liso, sua superfície interna é formada de uma estrutura histológica semelhante à dos pequenos lábios e a superfície externa apresenta folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

O epitélio vulvar constantemente sofre a influência de secreções vaginais, urina e fezes, além de traumas químicos por produtos de higiene e

físicos por peças de vestuário (FONSECA-MOUTINHO 2008). Sendo assim é grande o número de doenças que pode acometer a região da vulva, como as lesões de patologia cutânea específica, doenças sexualmente transmissíveis, repercussões de doenças locais e sistêmicas, urinárias ou cérvico-vaginais, lesões traumáticas e neoplasias benignas e malignas (MARTINS 1999) sendo que, dentre estas lesões, os tumores são as mais significativas (ROBBINS et al. 2006).

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

As estimativas de neoplasias atuais no Brasil, não mostram com clareza os dados acerca do carcinoma vulvar. Dados da Fundação Oncocentro apontaram, em 1990, uma incidência de 3,6/100.000 no estado de São Paulo e em 1992, o IARC, órgão da OMS, classificou a cidade de Recife-PE com a maior incidência no mundo: 5,6/100.000 (PARKIN et al. 1992). A Sociedade Americana de Câncer estimou que, aproximadamente, 3.900 novos casos de carcinoma de vulva seriam diagnosticados em 2010 nos Estados Unidos, resultando em 920 mortes.

## 1.2 ETIOLOGIA DO CARCINOMA VULVAR

Estudos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e moleculares demonstram que existem hoje duas classes de carcinomas vulvares: uma que não está relacionado a presença do papiloma vírus humano (HPV) e uma relacionado a presença do HPV (PINTO 2002; VAN DER AVOORT et al. 2006; LANNEAU et al. 2009).

Na primeira, as mulheres acometidas pela doença são mais velhas – de 55 a 85 anos de idade aproximadamente e desenvolvem, tipicamente, um tipo ceratinizante de carcinoma de células escamosas invasivo, estando associado ao líquen escleroso, hiperplasia escamosa, neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) diferenciada e mutações em p53, não estando estes tumores relacionados à infecção pelo HPV (MONK et al. 1995; PINTO 2002; WOELBER et al. 2009).

Na segunda classe as mulheres acometidas apresentam faixa etária entre 35 e 65 anos de idade nas quais os tumores, geralmente do tipo basalóide ou condilomatoso, estão frequentemente relacionados à infecção por HPV de alto risco, como o HPV16, 18 e 33. Existe um alto risco de aparecimento de tumores em outros sítios do trato genital inferior, principalmente na cérvix uterina, neste grupo (MONK et al. 1995; WOELBER et al. 2009).

### 1.3 FATORES DE RISCO

Sempre foi observado que o carcinoma vulvar acometia mulheres em idade mais avançada, entre 65 e 75 anos. Nos últimos anos têm se observado um aumento considerado da incidência tanto entre mulheres acima de 70 anos quanto em mulheres jovens (FRISTACHI 2004; BUXANT et al. 2005; WANG et al. 2008). Este aumento está relacionado, principalmente, à infecção pelo HPV, ao consumo de tabaco (PARKIN et al. 1992; INSINGA et al. 2008), presença de neoplasias intraepiteliais (VINs), dentre outros fatores.

As mulheres fumantes possuem um risco três vezes maior para o acometimento por carcinoma de vulva em relação às não fumantes. Apesar do mecanismo biológico pelo qual o fumo aumenta o risco deste tipo de neoplasia ainda não estar bem estabelecido. HUSSAIN et al. (2008) demonstraram a presença de componentes do cigarro como a nicotina e a cotinina, bem como seus metabólitos no muco cervical de pacientes fumantes. Estes componentes têm sido demonstrados por diminuir populações de células de Langerhans e linfócitos T, sendo estas responsáveis pela produção de Interleucina 2 (IL2) e pela propagação da resposta imune mediada por linfócitos T auxiliares (Th1), que é um mecanismo chave no combate à infecção pelo HPV. Sendo assim, um aumento da imunossupressão na paciente, gerado pela diminuição na concentração de IL2, parece atuar como um co-fator para a oncogênese

vulvar por meio do HPV (MADRETSMA et al. 1996; LI et al. 1997; GEISELHART et al. 1997; MCCUE et al. 2000; HUSSAIN et al. 2008).

#### **1.4 NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS VULVARES (VINS)**

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

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

O grupo das VINs diferenciadas representa as VINs de grau III, que se apresentam, geralmente, como lesões unifocais e que se localizam na proximidade de carcinomas escamosos invasivos bem diferenciados (FONSECA-MOUTINHO 2008). Em sua maioria, não estão associadas ao vírus do HPV, mas sim com líquen escleroso ou hiperplasia de células escamosas (KNOPP et al. 2009).

Ao contrário da antiga classificação de VINs I-III, a segregação em VINs clássicas ou diferenciadas (Tabela 1) permitiu a clara visualização da existência das duas vias do desenvolvimento do carcinoma de vulva citadas anteriormente, uma relacionada ao HPV e outra não relacionada. Desta forma, uma vez que uma proporção substancial de tumores invasivos da vulva apresenta lesões precursoras associadas, existe uma grande importância em se conhecer a história natural da VIN, visando prevenir o carcinoma vulvar e evitar cirurgias radicais para o seu tratamento.

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

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

### 1.4.1 Vírus do Papiloma Humano (HPV)

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

Uma vez nas células da camada basal a expressão gênica viral é firmemente reprimida pelo próprio sistema de defesa do organismo. Apesar disto, ainda existe neste momento uma expressão limitada de proteínas dos genes precoces virais E (do inglês *early*), E5, E6 e E7, o que resulta em um aumento da proliferação celular e expansão lateral das células infectadas. A proteína viral E5 parece ter importância nas fases iniciais do curso da infecção, através do estímulo do crescimento celular por meio da formação de complexos com EGFR, PDGFR, dentre outras proteínas do hospedeiro, além de prevenir o processo de apoptose seguido por dano ao DNA.

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

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

Estudos recentes têm demonstrado a prevalência de tipos específicos de HPV dentre os carcinomas de vulva. A maior parte concorda que o tipo 16 é o mais frequentemente encontrado, seguido dos tipos 33 e 18 (PINTO 2002). INSINGA et al. (2008) realizaram uma revisão sistemática a respeito da prevalência dos tipos de HPV dentre diversos tipos de neoplasias e lesões pré-neoplásicas de vagina, cérvix e vulva e demonstraram que, dentre os casos de carcinoma de células escamosas de vulva, o tipo mais frequente foi o HPV 16, seguido dos tipos 33, 6, 18 e 31. Infecções por mais de um tipo de vírus foi observada em 6% dos casos e a proporção de casos positivos para qualquer tipo de HPV dentre os carcinomas de vulva foi de 65%.

#### **1.4.2 Outros fatores de risco**

Aspectos comportamentais, reprodutivos, hormonais, genéticos, presença de outros carcinomas genitais, histórico de verrugas genitais, doenças inflamatórias crônicas vulvares, infecção pelo HIV e estados de imunossupressão também podem aumentar o risco de desenvolvimento do carcinoma vulvar (PINTO 2002; DAVIDSON et al. 2003) e ainda na idade avançada relacionada-se à ocorrência de mutações no epitélio vulvar,



decorrentes do processo de envelhecimento (PINTO 2002). Fatores que foram identificados para outros tumores epidermóides, como a exposição à luz solar e à radiação ultravioleta parecem não estar relacionados às lesões vulvares (POLLOCK et al. 2008).

Uma revisão retrospectiva em mulheres com carcinoma de vulva demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes com menos de 45 anos e HPV (Risco Relativo [RR], 11.34); fumo (RR, 2.83); mais de dois parceiros sexuais (RR, 2.87); início da vida sexual ativa antes dos 19 anos (RR, 2.43) e baixo status sócio-econômico (RR, 1.77). Já entre as pacientes com mais de 45 anos, a correlação foi estatisticamente significativa entre o risco relativo de carcinoma de vulva e VIN (RR, 23.6), residência em área rural (RR, 2.17) devido ao homens jovens terem habito frequente de coito com animais, baixo status sócio-econômico (RR, 1.89), menopausa antes dos 45 anos (RR, 1.84), maus hábitos de higiene (RR, 1.76), distúrbios endócrinos (RR, 1.94) e baixos níveis de vitamina A no soro (RR, 1.78) (BASTA et al. 1999).

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

## 1.5 TIPOS HISTOLÓGICOS

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

**Tabela 2** - Tipos Histológicos de neoplasia Vulvar

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

**Fonte:** HOLSCHNEIDER e BEREK (2002).

O carcinoma *in situ* (VIN) é considerado uma lesão precursora do carcinoma invasivo, existindo um histórico de passado positivo de carcinoma *in situ* em pacientes e a presença deste tipo de lesão coexiste nos limites de muitos carcinomas invasivos (POLLOCK et al. 2008). Da mesma forma, cerca de 60% dos carcinomas de vulva possuem VIN adjacente, sendo que nos casos de carcinoma superficialmente invasivo, existe esta coexistência em 85%. Líquen escleroso, comumente associado com hiperplasia e/ou VIN diferenciada pode ser encontrado nas adjacências do carcinoma vulvar em 15 a 40% dos casos (MOORE et al. 2009).

O carcinoma escamoso ceratinizante bem diferenciado ou CEC grau histológico 1 apresenta notável maturação celular e ceratinização. As células da camada basal exibem, tipicamente, atipia leve a moderada, sendo que esta atipia diminui a medida que as células maturam-se, e esta diminuição é vista na superfície do tumor e nos centros dos nichos tumorais invasores. Este tipo de tumor é frequentemente, associado à VINs diferenciadas e dermatoses inflamatórias, sendo geralmente negativas para o HPV (CRUM et al. 2005).

Os carcinomas de células escamosas moderadamente diferenciados (CEC de grau II) e pouco diferenciados (CEC de grau III) estão frequentemente associados ao HPV e apresentam como principais características a presença de camadas de células escamosas neoplásicas imaturas com alta relação núcleo-citoplasma; uma tendência de crescimento coesivo e que imita a doença intraepitelial; perda de polaridade celular e a tendência por formar camadas celulares irregulares; maturação variável,

ceratinização e pseudocoilocitose. Estes tumores são frequentemente, mas não invariavelmente, associados à VIN clássica e HPV (CRUM et al. 2005).

Outra categoria é formada pelos carcinomas verrucosos, que são definidos como carcinomas epidermóides muito bem diferenciados, com baixo risco de formação de metástases linfonodais. O tumor é exofítico e, além da falta de atipia, a invasão se faz em blocos celulares com contornos arredondados, de difícil avaliação. Uma característica deste tumor é a discreta interface epitélio-estroma, além de mínima ou nenhuma atipia basal ou superficial (CRUM et al. 2005; MOORE et al. 2009).

Além do tipo tumoral, a profundidade de invasão do tumor, espessura, padrão de crescimento, grau histológico, bem como a invasão do espaço vascular são características patológicas importantes. A profundidade de invasão é definida como a medida da junção dermoepidérmica até o ponto de invasão mais profundo do tumor. A espessura do tumor é a medida da superfície da lesão até o ponto de invasão mais profundo de invasão. Já o padrão de crescimento do tumor influencia nas taxas de metástases linfonodais e sobrevivência. Três aspectos descrevem os padrões de crescimento tumoral: (1) padrão de crescimento confluyente, onde se observa uma massa tumoral de células interconectadas, sendo este tipo de crescimento característico dos tumores profundamente invasivos; (2) crescimento de padrão compacto, compressivo, no qual o tumor mantém continuidade com o epitélio adjacente e infiltra como uma massa tumoral bem definida e circunscrita. Geralmente são tumores bem diferenciados e raramente invadem o espaço vascular; (3) padrão de crescimento digitiforme

(*finger-like, spray* ou difuso), padrão mais comum, e cujo crescimento é caracterizado por uma aparência trabecular com pequenas ilhas de células pouco diferenciadas na derme ou submucosa. A invasão do espaço vascular é mais comumente visto neste tipo de tumor que em outros de característica compacta (MOORE et al. 2009).

## **1.6 SINAIS E SINTOMAS**

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

O carcinoma vulvar pode ter uma variedade de apresentações clínicas com base na duração, local e no tipo histológico. As lesões podem ser ulcerativas, nodulares ou exofíticas e geralmente estão localizadas nos lábios e nas estruturas laterais da metade superior da vulva. As lesões que surgem no clitóris ou períneo são menos comuns, mas são locais primários nos quais as lesões são facilmente reconhecíveis (POLLOCK et al. 2008).

## **1.7 DIAGNÓSTICO**

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

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

De acordo com POLLOCK et al. (2008), é recomendado que todos os casos suspeitos de carcinoma vulvar sejam submetidos a biópsia para confirmar o diagnóstico e a caracterização histológica dessas lesões antes de qualquer terapia definitiva.

## **1.8 ESTÁDIO DA DOENÇA**

A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) adotou em 1989 um sistema de estágio cirúrgico modificado para o

carcinoma de vulva, o qual permaneceu quase sem alterações nas novas recomendações em 1995 (MOORE et al. 2009).

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

## **1.9 PADRÕES DE DISSEMINAÇÃO DO CARCINOMA VULVAR**

Os carcinomas vulvares costumam metastatizar de três maneiras distintas: Disseminação por crescimento local e extensão pelos tecidos adjacentes, disseminação por meio da embolização linfática para linfonodos regionais e disseminação por via hematogênica para sítios distantes. A descrição clínica objetiva do crescimento local do tumor, categorizada no TNM, é de grande valia para o estabelecimento de uma margem ampla na ressecção cirúrgica (MOORE et al. 2009).

## 1.10 FATORES PROGNÓSTICOS

A disseminação do carcinoma vulvar é, predominantemente, linfогênico. Podemos encontrar com menos frequência a disseminação por extensão direta, assim como a hematogênica, que é muito rara (HACKER 2005). Sendo assim, o fator prognóstico isolado mais importante para este tipo de tumor é o estado dos linfonodos, seguido pelo tamanho da lesão.

O grau histológico, a espessura do tumor, a profundidade da invasão do estroma e o envolvimento do espaço vascular linfático contribuem para o risco de envolvimento dos linfonodos, mas não são preditores independentes de sobrevida. As pacientes com linfonodos negativos têm taxa de sobrevida em cinco anos maior que 90%, em comparação com aproximadamente 50% nas pacientes com linfonodos positivos (HOMESLEY et al. 1993).

O número de linfonodos inguinfemorais positivos é um importante fator prognóstico. As pacientes com apenas um linfonodo microscopicamente envolvido têm prognóstico comparável àquelas com linfonodos negativos (HOLSCHNEIDER e BEREK 2002), enquanto a taxa de sobrevida em dois anos é de 20% nas pacientes com três ou mais linfonodos metastáticos. A taxa de sobrevida de pacientes com linfonodos pélvicos positivos é de aproximadamente 11%. Linfonodos que parecem fixos nas estruturas mais profundas da região inguinal ou na pele, geralmente significam doença em estágio avançado com um prognóstico ruim (POLLOCK et al. 2008).



Os tumores de estágio I e II ou tumores sem metástases linfáticas apresentam excelente sobrevida livre de doença após cinco anos de 90% a 95%, na maioria das vezes. As pacientes com somente um linfonodo positivo sem doença extra-nodal também parecem ter um excelente prognóstico, similar àquele de mulheres sem doença linfática. Os fatores prognósticos claramente identificados para a doença linfonodal são (1) a profundidade de invasão; (2) o número de gânglios comprometidos, independentemente da existência de doença nodal bilateral ou da presença de disseminação extranodal ou extracapsular; (3) o tamanho da metástase nos linfonodos (POLLOCK et al. 2008).

Apesar de muitos estudos terem demonstrado de forma consistente que o envolvimento dos linfonodos regionais é o fator de prognóstico mais importante do carcinoma vulvar, diversos estudos também demonstraram que o tamanho do tumor primário é um indicador significativo para a sobrevida, a recidiva local e também para a própria metástase linfática (POLLOCK et al. 2008).

## **1.11 TRATAMENTO**

Para o alívio sintomático da doente, bem como para evitar progressão da doença é necessário o tratamento imediato das lesões. Na década de 50, a vulvectomia radical era o tratamento mais utilizado (FONSECA-MOUTINHO 2008). O desenvolvimento deste tipo de cirurgia, juntamente com a linfadenectomia inguinfemoral bilateral, trouxeram uma grande

melhoria na sobrevida das pacientes. No entanto, a cirurgia radical está associada à complicações pós-operatórias, tais como significativa morbidade, deiscência da ferida, infecção e linfedema, além de trazer consequências psicossociais importantes, especialmente para as mulheres mais jovens (PODRATZ et al. 1983; ANDERSEN e HACKER 1983; MOORE et al. 2009).

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

## **1.12 VIA DE SINALIZAÇÃO DO WNT**

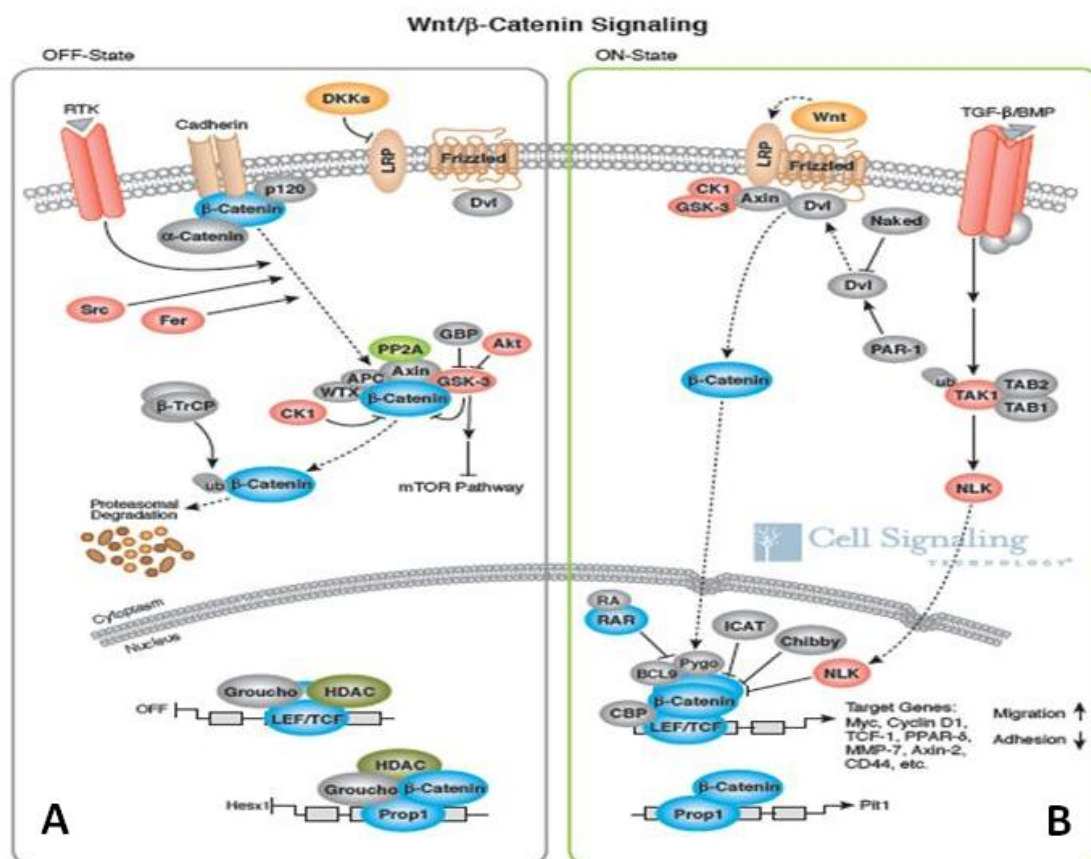
A via WNT (conhecida como Wingless Type) tem papel importante no desenvolvimento embrionário e nos processos homeostáticos de diversas espécies, no entanto quando está ativada de forma aberrante está associada

a carcinogênese (DOUCAS et al. 2006; GORDON e NUSSE 2006; MIKELS e NUSSE 2006).

Os genes da família do WNT codificam glicoproteínas secretoras de 38 a 45 KDa, que são produzidas em diferentes tecidos e células, estão associadas com a matriz extracelular, apresentam diversas funções, entre elas, proliferação celular e diferenciação durante o desenvolvimento embrionário (FINCH et al. 1997; KAWANO e KYPTA 2003).

Na via canônica, as proteínas Wnt agem através de receptores de superfície celular sinalizando para proteínas citoplasmáticas estabilizando a  $\beta$ -catenina, uma proteína multifuncional que age modulando a transcrição de genes alvos (BEHRENS e LUSTIG 2004).

A proteína Wnt, que se localiza no meio extracelular, induz uma cascata de sinalização intracelular se ligando a receptores transmembrânicos. Os receptores, mais conhecidos que ativam a via do WNT compreendem: os membros da família Frizzled (FZ) e os membros da família LRP 5 e LRP6 (Low-Density Lipoprotein Receptor Protein) (Figura 1).



**Legenda:** A: A proteína Wnt está desligada levando a fosforilação da  $\beta$ -catenina e sua degradação por proteossomas. B: Ligação da proteína Wnt ao seu receptor levando a destruição do complexo Axin-APC-GSK3 $\beta$  e acúmulo de  $\beta$ -catenina no citosol e sua translocação para o núcleo.

**Fonte:** Cell Signaling Technology (2010)

**Figura 1** - Estados da via de sinalização WNT

Na ausência da sinalização da via de WNT, a proteína citoplasmática Dishevelled (Dvl) não é ativada e a  $\beta$ -catenina que se encontra associada com o complexo citoplasmático Axin-APC-GSK3 $\beta$  é fosforilada. A fosforilação da  $\beta$ -catenina induz a sua degradação por proteossomas.

O Wnt é secretado para fora da célula, e no meio extra-celular interage com os seus receptores transmembrânicos, Frizzled (Fz) ou LRP5/6, ativa uma cascata de múltiplos passos. A ligação da proteína Wnt

ao seu receptor induz uma mudança estrutural no receptor que resulta no recrutamento da proteína Dishevelled (Dvl), que é então fosforilada. Esta subseqüentemente leva a inibição da GSK3 $\beta$  e a desintegração do complexo multiproteico Axin e APC (polipose adenomatosa *coli*) na qual GSK3 $\beta$  participa (FINCH et al. 1997).

Com a sinalização de Wnt, o complexo Axin-APC-GSK3 $\beta$  é destruído e não fosforila  $\beta$ -catenina. A  $\beta$ -catenina não fosforilada escapa do reconhecimento por proteossomas, e não é degradada, levando o seu acúmulo no citosol e sua translocação para o núcleo. No núcleo, a  $\beta$ -catenina interage com o fator de transcrição da família TCF que inclui TCF-1, TCF-3 e TCF-4 (fatores de crescimento de células T) e LEF-1 (fator de crescimento de linfócitos), levando a ativação da transcrição de genes alvos relacionados a proliferação celular, como Ciclina D1, CD44, CMYC, COX-2 entre outros (BAFICO et al. 1999).

A via do Wnt é modulada extracelularmente através de diversos grupos de proteínas secretoras, que agem como antagonista da via de sinalização de Wnt. Esses inibidores incluem membros da família das Secreted Frizzled- Related Protein (SFRP ou FRP), Fator Inibidor de Wnt (WIF), Cerberus, Dickkopf e Wise. As SFRPs, WIF e Cerberus podem se ligar diretamente a proteína Wnt impedindo sua interação com o receptor Frizzled. Alternativamente, a proteína Sfrp pode formar um complexo com o receptor Frizzled, bloqueando a sinalização de Wnt (BAFICO et al. 1999).

### 1.12.1 Alterações na via de sinalização do WNT e carcinogênese

A desregulação da via de sinalização de WNT tem sido implicada em muitas doenças hereditárias e no câncer. A ativação constitutiva da sinalização do WNT é um evento inicial em câncer colorretal e hepatocelular (CHEN et al. 2008).

Um exemplo conhecido de alteração desta via que leva a transformação neoplásica é a polipose adenomatosa familiar (FAP). A FAP é associada a mutações germinativas no APC (Adenomatous Polyposis Coli), caracterizada por centenas e milhares de pólipos intestinais, que surgem na puberdade, e com transformação maligna por volta dos 40 anos (LOGAN e NUSE 2004).

A presença de mutações nos componentes da via de sinalização WNT tem sido associada com uma variedade de cânceres humanos. Por exemplo, mutações na linhagem germinativa do gene APC podem causar tumor colorretal. Mutações somáticas no gene APC estão associadas com mais de 80% de adenomas e carcinomas esporádicos colorretais.

Algumas mutações no provável sítio de fosforilação de GSK3- $\beta$  têm sido mostrado em muitos cânceres humanos, como carcinoma colorretal, hepatocelular e melanoma. Mutações no gene da Axin têm sido identificadas em carcinoma hepatocelular (CHEN et al. 2008). Também foram observadas outras alterações na via WNT. Em linhagens celulares de neoplasias de cabeça e pescoço, por exemplo, foram identificados níveis elevados de RNAm das Wnts 1, 7, 10b e 13. Foram identificadas evidências que o bloqueio da sinalização Wnt1 leva a redução na proliferação e aumento na

apoptose. Estes efeitos são acompanhados pela redução na Ciclina D1 e  $\beta$ -catenina (DOUCAS et al. 2006).

Alterações na expressão dos receptores Frizzled também pode estar associada à invasão tumoral, uma vez que, enquanto FZD1 e FZD2 não são expressos na mucosa colônica normal, e em tumores bem diferenciados, há um alto nível de expressão destes receptores em tumores indiferenciados (DOUCAS et al. 2006).

Sabe se que mutações no gene CTNNB1 (o gene que codifica a  $\beta$ -catenina) e o acúmulo nuclear da  $\beta$ -catenina são importantes no desenvolvimento de muitos tumores. A  $\beta$ -catenina pode ser ativada por outros mecanismos, tais como alterações em outros componentes da via de sinalização WNT, que podem levar a redução na destruição da  $\beta$ -catenina (DOUCAS et al. 2006).

A expressão nuclear da  $\beta$ -catenina está aumentada em 75% nos tumores colônicos, em 56% nos tumores gástricos e em 26,9% nos tumores hepatocelulares (DOUCAS et al. 2006).

Em orofaringe, foi comprovado *in vitro* que os oncogenes E6 e E7 do HPV 16 estão envolvidos no acúmulo de  $\beta$ -catenina nuclear e ativação da via de sinalização Wnt (RAMPIAS et al. 2010).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão das proteínas da via WNT em carcinomas vulvares, através da técnica de imunistoquímica e correlacionar as possíveis alterações na via de sinalização do WNT com a presença ou ausência de HPV em busca de marcadores moleculares preditivos de melhor e/ou pior prognóstico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Avaliar a expressão imunistoquímica dos seguintes marcadores da via WNT: Wnt1, Wnt2, Frizzled1,  $\beta$ -Catenina, Gsk3  $\beta$  fosforilado e não fosforilado, Ciclina D1, CD44, CMYC.
- 2 Realizar a genotipagem de HPV estabelecendo os tipos infectantes.
- 3 Comparar os dados de expressão proteica com parâmetros clínico-patológicos e tipos de HPV infectantes.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 PACIENTES E ESPÉCIMES ANATOMOPATOLÓGICOS**

Foram selecionados através de análise de prontuários 150 casos com carcinomas vulvares, provenientes de pacientes que sofreram intervenção cirúrgica no Hospital A.C.Camargo no período de 1979 a 2006.

Os blocos de parafina foram selecionados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo. Todos os casos foram reavaliados por dois patologistas e somente 120 foram incluídos no estudo por serem caracterizados histologicamente como carcinoma epidermóide vulvar e apresentarem material suficiente para análise, os 30 casos restantes não foram incluídos no grupo de estudo, por serem caracterizados como carcinoma *in situ* e/ou não haver material suficiente para análise no bloco de parafina.

#### **3.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS**

Os dados clínicos das pacientes foram coletados dos prontuários da Subdivisão de Arquivos Médicos e Estatísticos (SAME) do Hospital, dentre eles: idade, etnia, status menopausal, tamanho do tumor, grau nuclear, grau histológico, presença inflamação, componente *in situ* associado, status

linfonodal, estadiamento, data de início do tratamento, tipo de tratamento, recidiva, local da recidiva, sobrevida livre de doença e tempo de sobrevida.

### **3.3 CONSTRUÇÃO DOS MICROARRANJOS DE TECIDO (TMAS)**

Todos os casos selecionados passaram por revisão de diagnóstico, através da análise das lâminas de H&E correspondentes, com o auxílio de um microscópio óptico binocular modelo Nikon<sup>®</sup> (Eclipse E100). As áreas representativas dos tumores foram selecionadas nas lâminas e foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor através do Manual Tissue *Arrayer* 1 (Beecher Instruments Micro-*array* technology, Silver Spring, USA) para a confecção dos TMAs. Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata nos TMAs, compreendendo regiões diferentes do tumor. Cortes seriados de 4 $\mu$  de espessura dos blocos dos TMAs foram depositados em lâminas carregadas eletricamente (Starfrost<sup>®</sup>). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas à - 20°C até o momento da realização da imunoistoquímica (IIQ).

### **3.4 A IMUNOISTOQUÍMICA (IIQ)**

As lâminas de TMAs embebidas em parafina foram retiradas do freezer a -20°C e, após atingirem temperatura ambiente, foram colocadas na

estufa a 60°C *overnight* para retirar o excesso de parafina. Em seguida, foram colocadas em xilol por 20 minutos.

A reação de imunistoquímica foi realizada de modo automatizado na plataforma Benchmark® - Ventana Medical Systems (Illkirch, Cedex, França), (Figura 2), e utilizou os seguintes reagentes:

- a) Fluidos Volumosos: (1) *EZ PREP*: solução de desparafinização patenteada pela Ventana, livre de álcool e xilol e cuja formulação dos reagentes não está disponível. Juntamente com as placas aquecidas onde são depositadas as lâminas, é responsável pela desparafinização; (2) *LCS (Liquid Coverslip)*: Solução oleosa de baixa densidade responsável por formar uma câmara de reação sob o tecido de modo a permitir uma homogeneização dos reagentes sobre a lâmina, bem como não deixar que eles evaporem e ressequem durante o processo; (3) *CC1 (Cell Conditioning One)*: Solução tampão de pH levemente alcalino a base de TRIS usada como pré-tratamento no processamento de tecidos. Quando em alta temperatura, é capaz de romper as ligações covalentes formadas pela formalina no tecido, permitindo a reativação antigênica e aumentando a acessibilidade ao anticorpo. (4) *Reaction Buffer*. Solução de tampão pH 7,4 responsável por promover um ambiente aquoso para a reação imunistoquímica e pela lavagem das lâminas entre os vários passos da reação.
- b) Kit de detecção – *UltraView Universal DAB Detection Kit* - Trata-se de um kit contendo 5 dispensadores que conta com uma tecnologia baseada em um sistema de detecção por multímeros para a detecção

sensível e específica de anticorpos primários de coelho e camundongo. O kit é livre de biotina, eliminando a marcação inespecífica proveniente da biotina endógena. Além dos componentes do kit de detecção, são acoplados à rack no momento da realização da técnica, dois dispensadores: (1) Hematoxilina: Hematoxilina de Mayer's modificada; e (2) *Bluing Reagent*: solução aplicada após a hematoxilina para fornecer uma contra-coloração à primeira.

Previamente às reações nas lâminas de TMA, todos os anticorpos utilizados no estudo foram padronizados em cortes inteiros de tumores vulvares juntamente com controles positivos para cada tipo de proteína.

Os anticorpos usados bem como a sua padronização estão representados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica.

ANTICORPO	FABRICANTE	CLONE	DILUIÇÃO	TECIDO CONTROLE
<b>Wnt1</b>	Abcam	ab15251/Policlonal de Camundongo	1:100	Carcinoma de mama
<b>Wnt2</b>	Abcam	ab50575/Policlonal de Coelho	1:200	Pulmão
<b>Frizzled1</b>	Genway	4503825/Policlonal de Camundongo	1:200	Pulmão
<b>β-Catenina</b>	Neomarker	nk4237/Monoclonal de Coelho	1:25	Tonsila
<b>Gsk3β não fosforilada</b>	Cell Signaling	9582/Monoclonal de Camundongo	1:80	Fígado
<b>Gsk3β fosforilada</b>	Cell Signaling	27C10/Monoclonal de Camundongo	1:50	Fígado
<b>Ciclina D1</b>	Bio SB	RBT14/Monoclonal de Camundongo	1:100	Carcinoma de mama
<b>Cd44</b>	Novacast	DF1485/Monoclonal de Camundongo	1:40	Tonsila
<b>C-Myc</b>	Thermo	9E10.3/Monoclonal de Rato	1:200	Carcinoma de mama

A montagem das lâminas foram realizadas de modo automatizado utilizando o equipamento TissueTek®.

### **3.5 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA**

A expressão das proteínas da via WNT foram avaliadas quantitativamente com o auxílio do Sistema Automatizado de Imagem (APERIO®), que consiste de um microscópio digital automatizado e de um computador com um programa de captura de imagem e processamento digital. Cada lâmina corada por imunistoquímica foi digitalizada e as imagens capturadas foram revisadas pelo patologista na tela do computador. O APERIO® possui uma ferramenta de seleção de imagem que o patologista utilizou para marcar apenas a região de interesse a ser avaliada. O APERIO® é capaz de detectar, contabilizar a marcação baseados nos níveis de matriz, saturação e luminosidade. O sinal é então convertido para mensuração de densidade numérica.

Os que apresentaram a densidade numérica entre 0 e 1 foram considerados negativos, os que ficaram entre 1 e 2 fracos positivos, 2 e 3 positivos moderados e os maiores que 3 positivos forte.

Para realização da estatística foram agrupados os resultados 0 e 1 como negativos e 2 e 3 como positivos.

### **3.6 GENOTIPAGEM DE HPV**

O teste de genotipagem de HPV foi realizado em 110 amostras de carcinoma vulvar obtidas de material parafinado utilizando, o kit Linear Array HPV (Roche). Por se tratar de material parafinado as amostras com mais de 10 anos foram mais difíceis de amplificar via PCR, 10 das 120 amostras iniciais não amplificaram restando apenas 110. O teste é qualitativo, utiliza amplificação do DNA alvo através de reação de polimerização em cadeia, hibridização de ácidos nucléicos e detecta 37 genótipos de DNA anogenitais, dentre eles HPV de alto risco (tipos 16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58, 59,66,68 e 82); de baixo risco (HPVs tipos 6,11,40,42,54,61,70,72,81 e CP6108); e HPV de risco ainda desconhecido (55,62,64,67,69,71,73,83,84 e IS39 – HPV82).

Este teste baseia-se em quatro processos principais: preparação da amostra (isolamento de DNA e purificação); amplificação por PCR do DNA alvo usando iniciadores para o HPV; hibridação dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica, em fita.

#### **3.6.1 Extração do DNA genômico de tecidos parafinados**

Foram realizados quatro cortes de 5 µm do material tumoral do bloco parafinado. Esses cortes foram colocados em microtubos, adicionando 180 µL do tampão ATL e 20µL de Proteinase K e em seguida esse material foi colocado em termomixer e incubado a 56°C overnight. Foram adicionados 200 µL do tampão AL e 110 µL de etanol absoluto e incubados. O material

foi, então, transferido para uma coluna específica (QIAamp MinElute Collumn), que passou por centrifugação. Foram adicionados nesta coluna 500 µL de tampão AW1 e AW2 e para cada coluna específica foram aplicados, no centro da membrana, 20 a 100µl de tampão AE, deixando o material incubado em temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a 20.000 xg por 1 minuto e retirada a coluna. O DNA extraído foi quantificado no equipamento Nanodrop em comprimento de onda 260/280 e 260/230 e a sua qualidade foi checada em gel de agarose.

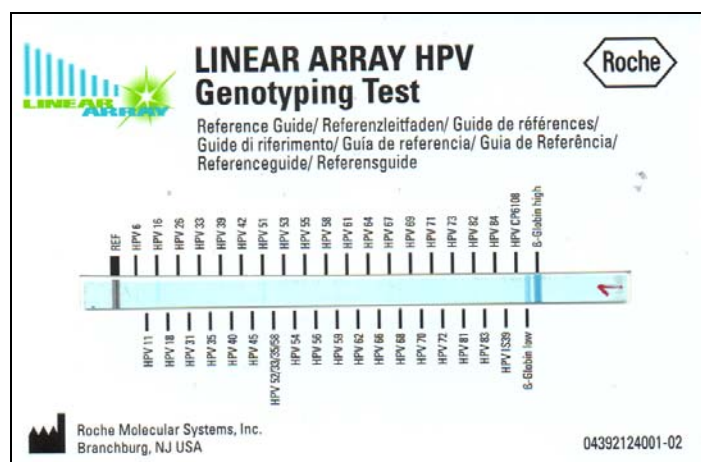
### **3.6.2 Amplificação por PCR**

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

### **3.6.3 Hibridação / Detecção dos Subtipos de HPV**

Os amplicons do HPV e da  $\beta$ -globina gerados pelo PCR foram desnaturados quimicamente para formar um DNA de fita simples, através da adição de solução de desnaturação. As alíquotas do amplicon desnaturado foram, depois, transferidas para o reservatório adequado da bandeja de tipagem contendo o tampão de hibridação e uma única tira de Genotipagem Linear Array HPV, que é revestida com bandas da sonda para os HPVs específicos,  $\beta$ -globina low e  $\beta$ -globina high.

Após hibridização, a tira de genotipagem foi rigorosamente lavada, e foi adicionado o Conjugado Estreptavidina-peroxidase, que se liga ao amplicon marcado com biotina. Na presença de peróxido de hidrogênio, a peroxidase que se encontra ligada, catalisa a oxidação para formar um complexo de coloração azul, que precipita nas posições da sonda onde ocorre a hibridização. As tiras foram lidas com auxílio de uma guia de referência do kit de genotipagem LINEAR ARRAY HPV (Roche), representado na Figura 2.



**Legenda:** Guia de referência com um caso negativo para HPV.

**Figura 2** - Guia de referência do teste de genotipagem LINEAR ARRAY HPV (Roche)

### 3.7 A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Associações entre os parâmetros clínicos-patológicos e a expressão das proteínas da via do WNT foram realizadas por meio do teste qui-quadrado, seguidos pelo teste exato de Fisher.



Nas análises de sobrevida câncer específica e livre de doença/recidiva, foi empregado o método de Kaplan-Meier. A diferença entre curvas de sobrevida foi avaliada pelo teste de Log rank.

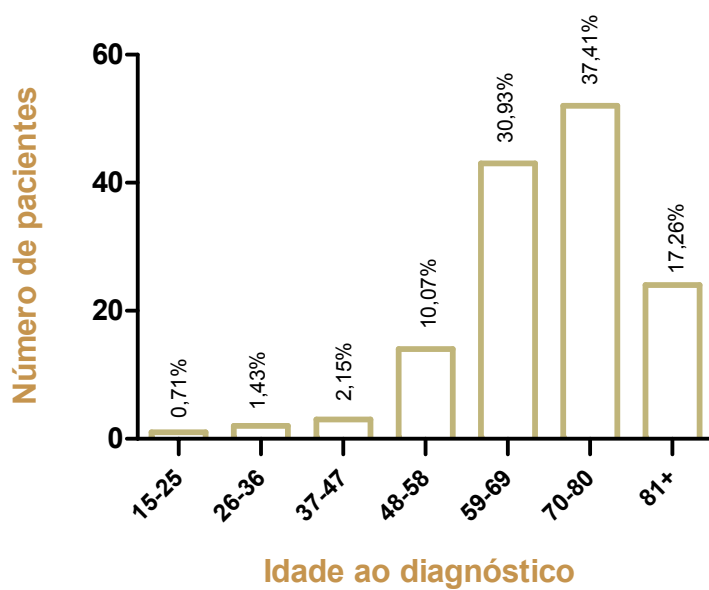
O nível de significância adotado foi o de 5% ( $p=0,05$ ). O programa estatístico SPSS v.17.0 foi empregado na análise estatística.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO**

#### **4.1.1 Dados Demográficos**

No presente estudo as pacientes selecionadas apresentam uma média de idade de 69 anos (desvio padrão: 12), variando de 15 a 98 anos e com uma mediana de 71 anos. Grande parte das pacientes pertence ao grupo de faixa etária correspondente às idades entre 70 e 80 anos (37%), como mostrado na Figura 3. Em relação à raça, a maior parte das pacientes é de cor branca (89%), seguida da raça parda (9%) e negra (1%). Quanto ao estado civil, a maioria se declarou casada (50%), seguido de viúvas (38%), solteiras (9%) e separadas (3%). Já em relação à escolaridade, a quase totalidade das mulheres (78%) relatou ser analfabetas ou possuir primeiro grau incompleto. A distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar segundo, idade, raça, estado civil e escolaridade está disposta na Tabela 4.



**Figura 3** - Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar por faixas etárias.

**Tabela 4** - Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar submetidas à ressecção cirúrgica segundo idade, raça, estado civil e escolaridade (São Paulo, 2011).

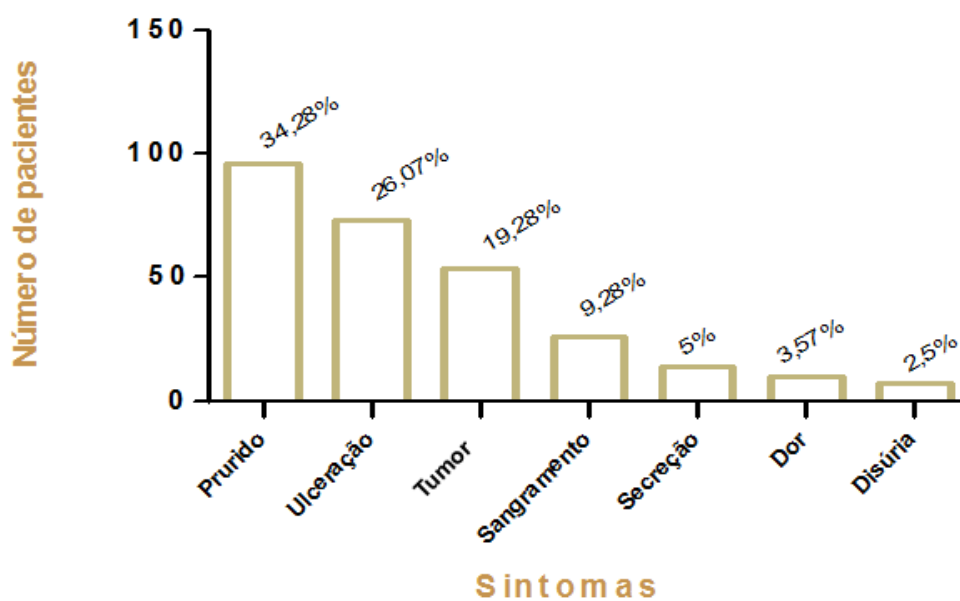
<b>Características sócio-demográficas</b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>			
	Média	69	
	Mediana	71	
	Desvio Padrão	12	
	Mínimo	15	
	Máximo	98	
<b>Raça</b>			
	Branca	107	88,8
	Não Branca	13	11,2
<b>Estado Civil</b>			
	Solteira	10	8,95
	Casada	60	50,0
	Separada	4	2,9
	Viúva	46	38,05
<b>Escolaridade</b>			
	Analfabeta	38	34,23
	1º grau incompleto	49	44,14
	1º grau completo	1	0,9
	2º grau incompleto	13	11,7
	2º grau completo	6	5,4
	Superior completo	4	3,6

#### 4.1.2 Dados Clínicos das pacientes

Os dados clínicos obtidos dos prontuários das pacientes (Tabela 5) demonstraram uma média de idade da menarca em 14 anos, variando entre idade mínima de 10 e máxima de 20 anos e com uma mediana de 13 (desvio padrão (SD): 2). Em relação à menopausa, a média de idade foi de 48 anos, com mediana de 50 anos (desvio padrão: 9,83), sendo a idade máxima de 64 anos. A média de idade da primeira relação sexual declarada pelas pacientes foi de 19 anos, com mediana de 19 anos (SD: 7,02) sendo a idade

mínima de 11 e máxima de 43 anos. Quanto ao número de gestações, a média foi de 6 gestações, com mediana de 5 (SD: 0,61) e uma média de partos de aproximadamente 5 partos, com mediana de 5 (SD: 4). Em relação a abortos, a maioria das pacientes declarou não ter tido nenhum aborto (58%), seguido de 1 aborto (19%), 2 abortos (16%) e 3 ou mais abortos (7%). A maior parte das mulheres do nosso estudo declarou ter tido apenas um parceiro sexual durante a vida (88%), seguido de nenhum parceiro (6%), dois (3%) e quatro parceiros (3%). Finalmente, relacionado ao uso de anticoncepcionais, 95% das pacientes declararam nunca ter feito uso destes e 5% fizeram uso no passado. A distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar quanto aos dados clínicos (São Paulo, 2011) estão apresentados na Tabela 5.

Sintomas comumente relatados pelas pacientes do estudo estão demonstrados na Figura 4. Prurido foi o mais comum (34%), seguido por ulceração (26%) e presença de tumor (19%). Sangramento (9%), secreção (5%), dor vulvar (4%) e disúria (2,5%), ainda que presentes foram menos comuns. O tempo médio de duração dos sintomas relatados pelas pacientes foi de 11 meses, com mediana de 6 meses, variando de 15 dias a 10 anos de duração (SD:16,67).



**Figura 4** - Distribuição de sintomas comumente relatados pelas pacientes com carcinoma vulvar.

**Tabela 5** - Distribuição das pacientes portadoras de carcinoma vulvar quanto aos dados clínicos (São Paulo, 2011).

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

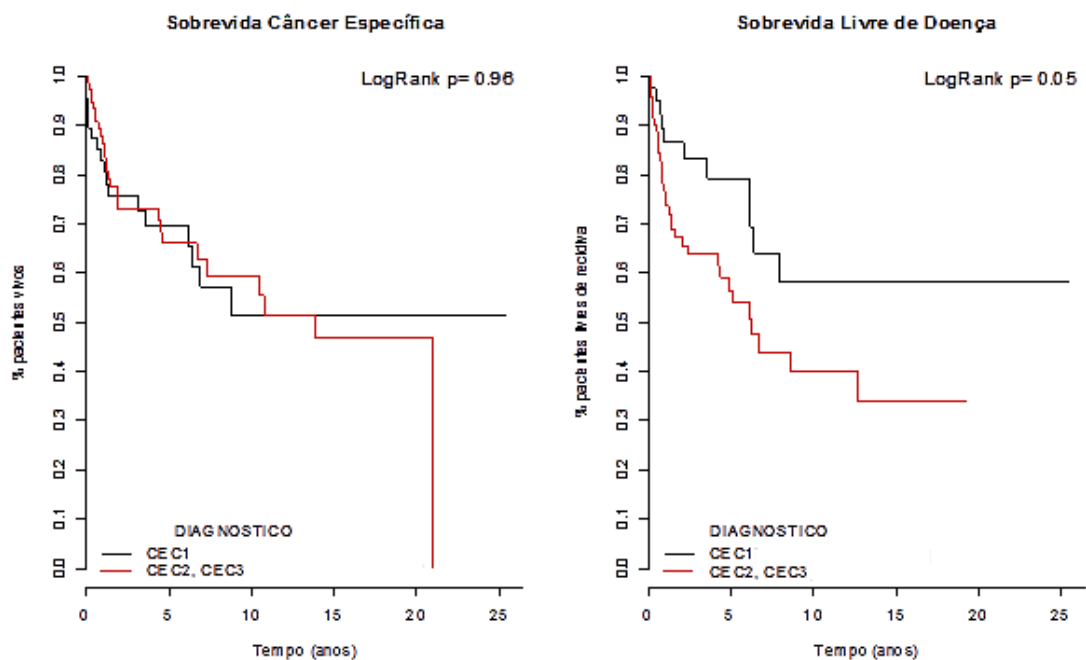
## 4.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANÁTOMO-PATOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Na avaliação anátomo-patológicos dos tumores, contatou-se que grande parte da amostra foi constituída de peças cirúrgicas (73%), seguido de biópsias (21%) e revisões de lâminas com blocos de parafina disponíveis (6%). A maior parte dos tumores foram classificados como CEC 2 (44%), seguido de CEC1 (34%), CEC 3 (10%). Quanto à sobrevida, quando comparada em relação aos tipos histológicos bem diferenciados (CEC 1) e os moderadamente e pouco diferenciados (CEC2, CEC3), foi observado uma pior sobrevida livre de doença, em 5 anos, em pacientes portadores de tumores CEC2/CEC3 (57%) quando comparados com pacientes com CEC1 (79%) ( $p=0,05$ ) (Figura 5). Em relação na sobrevida câncer específica não houve diferença entre os grupos ( $p=0,96$ ). Imagens representativas dos diferentes tipos histológicos são encontradas na Figura 6.

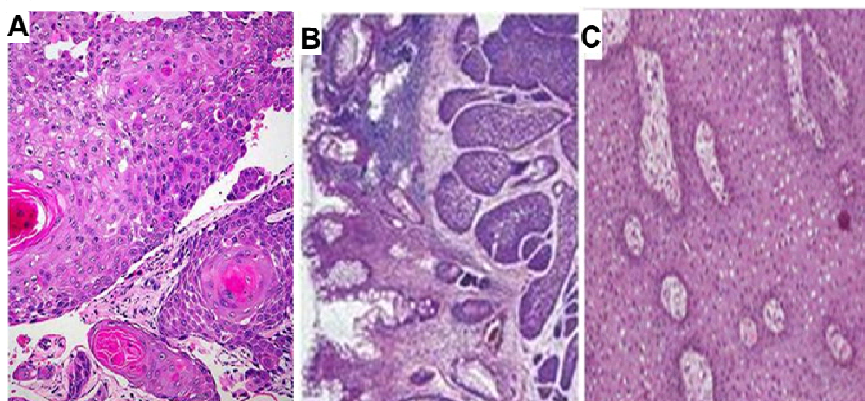


**Tabela 6** - Distribuição das amostras em relação às características anátomo-patológicas dos tumores (São Paulo, 2011).

<i>Características anátomo-patológicas dos tumores</i>			
Diagnóstico		n	%
	CEC 1	47	39,5
	CEC 2	61	51,2
	CEC 3	11	9,3
	Soma	119	
Profundidade da Invasão			
	Derme superficial	11	9,4
	Derme	61	52,1
	Derme profunda	34	29,1
	Subcutâneo	11	9,4
	Soma	117	
Infiltrado inflamatório			
	Leve	31	26,5
	Moderado / Alto	86	73,5
	Soma	117	
Invasão			
Vascular	Ausente	97	84,3
	Presente	18	15,7
	Soma	115	
Perineural	Ausente	100	84,3
	Presente	13	15,7
	Soma	113	
Metástase Linfonodal			
	Ausente	39	60,9
	Presente	25	39,1
	Soma	64	



**Figura 5** - Curvas de sobrevivida global em 5 anos em relação aos diferentes tipos histológicos dos tumores de vulva.



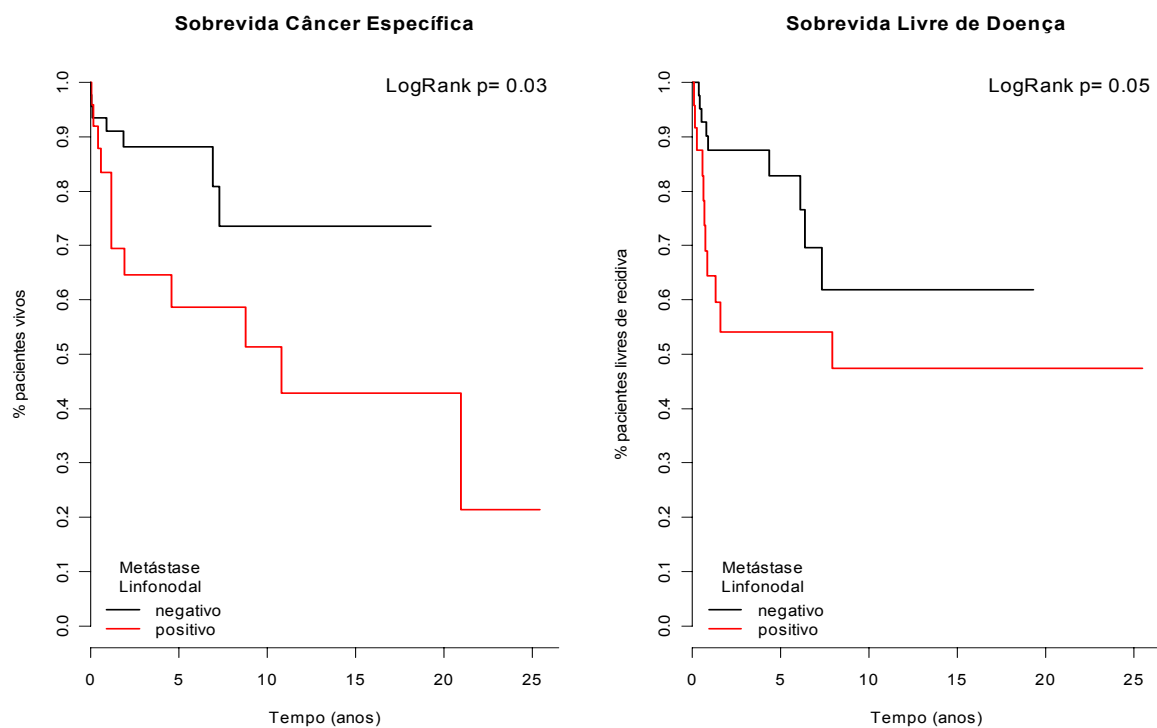
**A:** Carcinoma escamoso queratinizante; **B:** Carcinoma basalóide; **C:** Carcinoma verrucóide.

**Figura 6** - Lâminas de H&E evidenciando os diferentes tipos histológicos CEC de vulva.

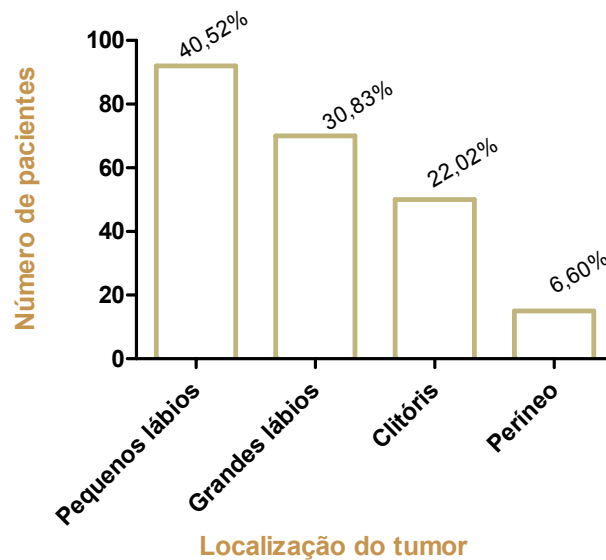
Em relação à profundidade de invasão do tumor, 9,4% infiltraram a derme superficial, 52,1% dos tumores infiltraram a derme, 29,1% dos tumores infiltraram a derme profunda e 9,4% infiltraram o tecido subcutâneo.

Infiltrado inflamatório moderado foi o mais comumente observado (73,5%). Na maior parte dos tumores não foram identificadas invasão vascular (84,3%) ou perineural (84,3%). Em relação à metástase linfonodal, 60,9% não apresentaram linfonodos acometidos, ao passo que 39,1% tiveram algum grau de acometimento linfonodal. As pacientes sem metástase linfonodal tiveram uma sobrevida câncer específica e livre de doença maior (88% e 83%, respectivamente), do que as pacientes que tiveram metástases linfonodais (59 e 54%, respectivamente) ( $p=0,03$  e  $p=0,05$ , respectivamente) Figura 7.

Características clínicas em relação à localização: a maior incidência foi nos pequenos lábios (41%), seguida dos grandes lábios (31%), clitóris (22%) e períneo (7%), como mostra o Figura 8. Quanto à lateralidade do tumor, grande parte era unilateralmente encontrada (72%), 16% eram bilaterais, 7% centrais e 5% eram unilaterais, mas acometiam a linha média da vulva.

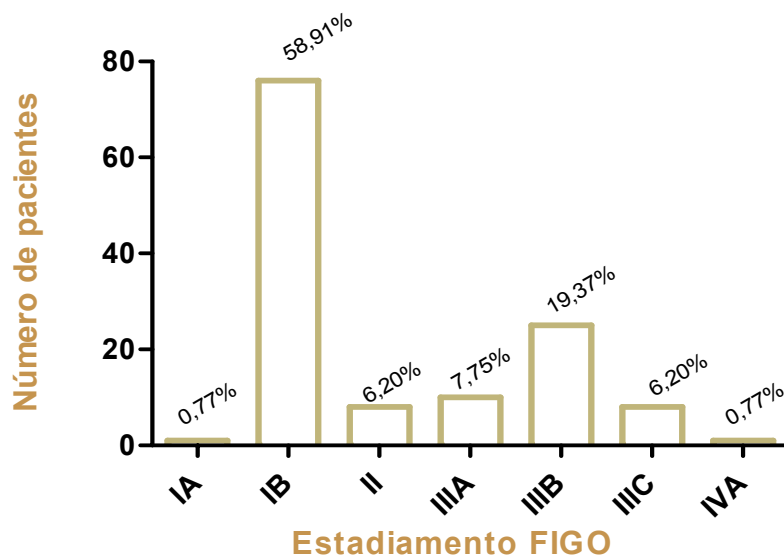


**Figura 7** - Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação à metástase linfonodal.

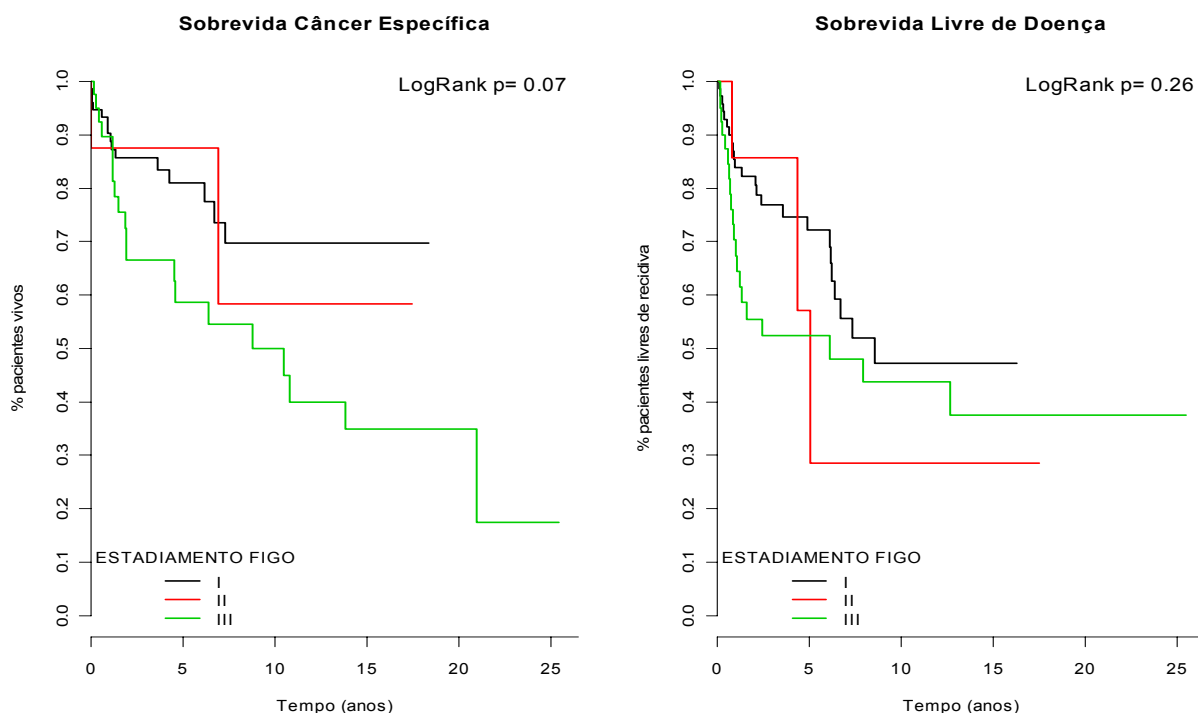


**Figura 8** - Distribuição dos tumores do estudo em relação à localização

Dentre a nossa casuística, a maior parte dos tumores foi classificada como estadiamentos FIGO IB (59%) e IIIB (19%), como demonstrado na Figura 9. Pacientes cujos tumores apresentaram estadiamento III apresentaram sobrevida câncer específica, em 5 anos, de 59%, sendo esta menor que a das pacientes com tumores estadiamento I (81%) ou estadiamento II (88%), com nível de significância marginal ( $p=0,07$ ), como mostrado na Figura 10. Em relação a sobrevida livre de doença não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,26$ ).



**Figura 9** - Distribuição dos tumores em relação ao estadiamento FIGO



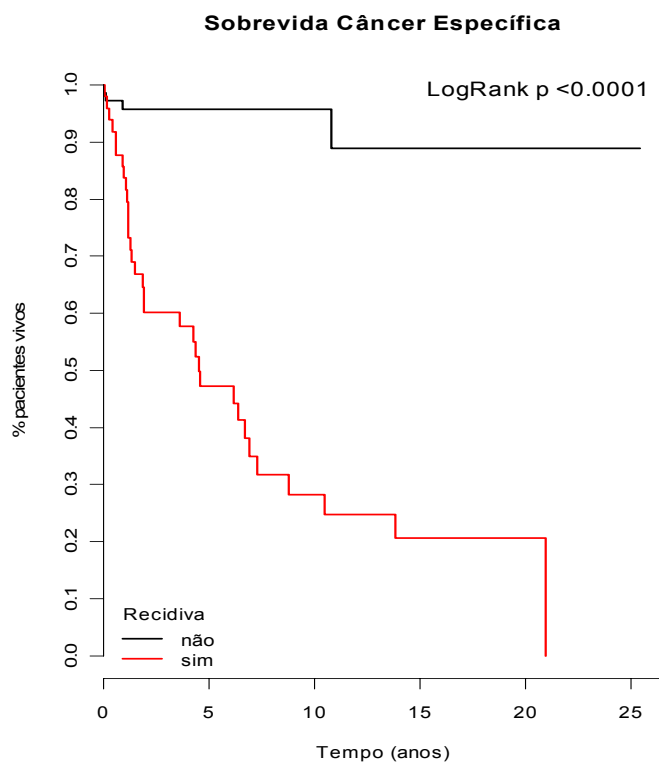
**Figura 10** - Curvas de sobrevida câncer específica e livre de doença em relação aos estadiamentos tumorais dentre as pacientes com carcinoma vulvar.

Todas as pacientes avaliadas neste estudo realizaram cirurgia de vulva no Hospital A.C. Camargo, sendo que a mais comumente realizada foi a vulvotomia radical tripla incisão (57%), seguido da hemivulvotomia (20%), vulvotomia radical clássica (13%) e ressecção local ampla (10%). Cerca de 20% das pacientes receberam tratamento adjuvante: 14% receberam quimioterapia adjuvante e 5% radioterapia adjuvante.

Observamos que 54% das mulheres tiveram complicações ao tratamento, sendo a mais comum a deiscência da ferida (42%). Infecção foi presente em 21% e necrose do retalho em 18%. Seroma e linfedema foram

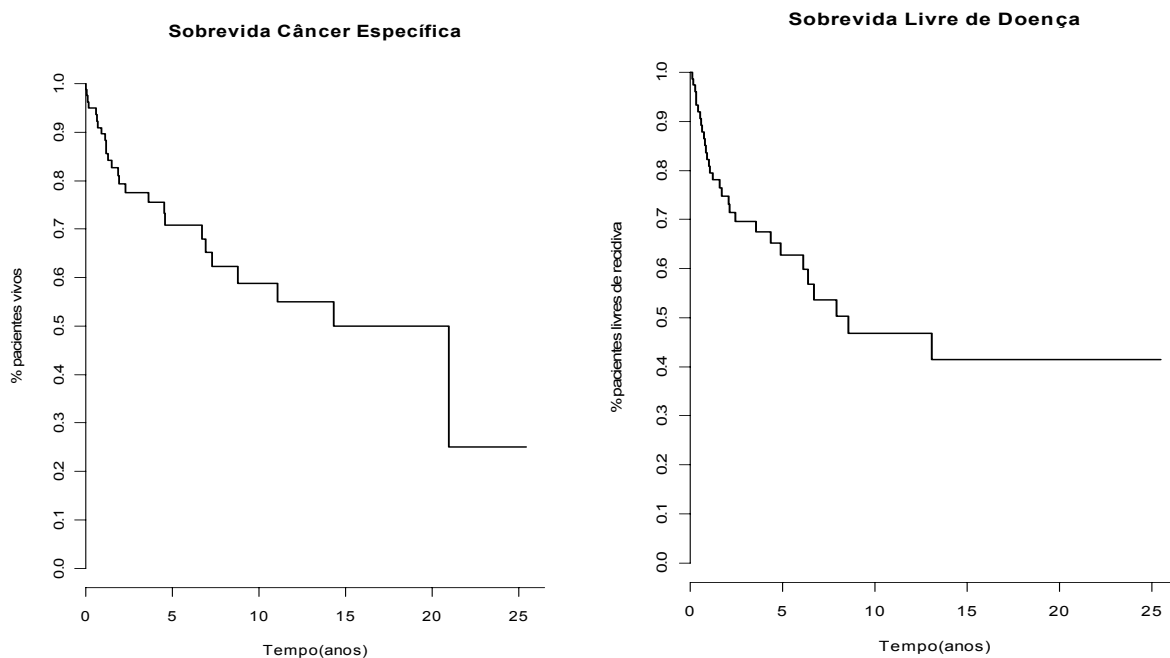
menos comuns, acometendo 8% e 11%, respectivamente.

Houve recorrência em 38%, sendo a recorrência local (41%) e linfonodal (26%) as mais frequentes. Dentre as mulheres que sofreram qualquer tipo de recidiva tumoral, 65% morreram de câncer. A curva de sobrevida global em 5 anos das pacientes em relação à presença ou não de recidiva tumoral está demonstrada na Figura 11 e demonstrou pior sobrevida ( $p < 0,0001$ ) em pacientes que sofreram qualquer tipo de recorrência (47%) quando comparadas àquelas que não sofreram nenhum tipo de recidiva (96%). Já em relação ao *status* global das pacientes, 41% estavam vivas sem câncer no momento da coleta dos dados de prontuário, 33% morreram da doença, 13% morreram de outras causas, 7% estavam vivas com a doença e 5% morreram de causas não especificadas.



**Figura 11** – Sobrevida global das pacientes em relação à recidiva do tumor

A curva de sobrevida câncer específica traçada para as nossas pacientes demonstrou que cerca de 70% estavam vivas em 5 anos, ao passo que a curva de sobrevida livre de doença demonstrou que cerca de 65% das mulheres não sofreram recidiva tumoral no espaço de tempo equivalente a 5 anos, como demonstradas na Figura 12.



**Figura 12** - Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença das pacientes com carcinoma vulvar



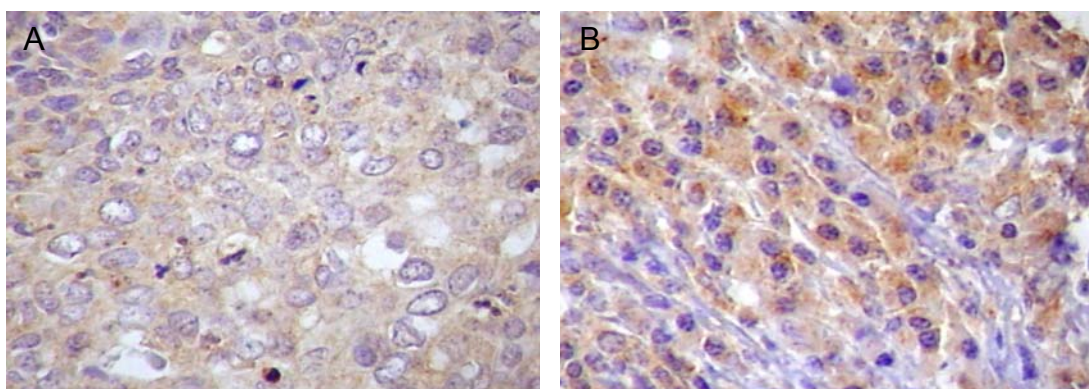
### 4.3 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DA VIA WNT EM CARCINOMAS VULVARES

#### 4.3.1 Imunoistoquímica

#### 4.3.2 Wnt1

Foi observada marcação positiva para proteína Wnt1 em 49 (32%) dos casos. Imagem mostrando a positividade e negatividade desta proteína nos diferentes compartimentos celulares estão ilustradas na **Figura 13**. Pudemos observar uma marcação citoplasmática e de membrana na células epiteliais.

Não pudemos observar associação entre a expressão de Wnt1 e os parâmetros clínicos-patológicos (Tabela 7) e nem com Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos ( $p=0,56$  e  $p=0,19$ , respectivamente).



**Legenda:** **A:** Imunoistoquímica negativa para Wnt1; **B:** Imunoistoquímica positiva para Wnt1.

**Figura 13** - Imunoistoquímica para Wnt1 em carcinomas vulvares.

**Tabela 7** - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Wnt1 em CEC vulvar

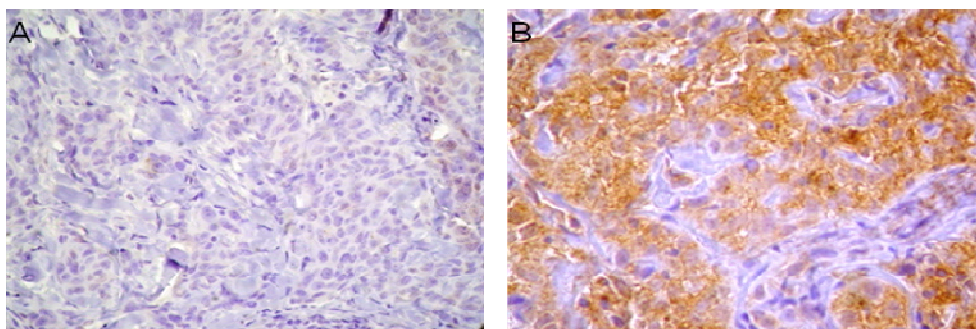
Parâmetros Clínico-patológicos	Expressão de Wnt1			p (value)
	Total(n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Profundidade de invasão				
Derme superficial / derme	72	21 (30)	51 (70)	0,227
Derme profunda / subcutâneo	45	18 (40)	27 (60)	
NA	03			
Infiltrado inflamatório				
Leve	31	09 (29)	22 (71)	0,480
Moderado / alto	86	31 (36)	55 (64)	
NA	03			
Invasão vascular				
Ausente	97	31 (32)	66 (68)	0,909
Presente	18	06 (33)	12 (67)	
NA	05			
Invasão perineural				
Ausente	100	33 (33)	67 (67)	0,872
Presente	13	04 (31)	09 (69)	
NA	07			
Metástase Linfonodal				
Ausente	39	12 (31)	27 (69)	0,664
Presente	25	09 (36)	16 (64)	
NA	56			
Estadiamento FIGO				
I / II	64	20 (32)	44 (68)	0,815
III / IV	48	16 (34)	32 (66)	
NA	08			
Recidiva				
Ausente	68	24 (36)	44 (64)	0,465
Presente	42	12 (29)	30 (71)	
NA	10			

**Legenda:****NA:** Não disponível**Negativo:** scores 0 e 1+**Positivo:** scores 2+ e 3+

### 4.3.3 Wnt2

Foi observada marcação positiva para proteína Wnt2 em 58 (49%) dos casos, já 61 casos (51%) apresentaram ausentes de marcação. Imagens representativas das reações de imunohistoquímica para o anticorpo WNT2 são ilustradas na Figura 14.

Não pudemos observar associação entre a expressão de Wnt2 e os parâmetros clínicos-patológicos (Tabela 8) e nem com Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos ( $p=0,65$  e  $p=0,24$ , respectivamente).



**Legenda:** **A:** Imunoistoquímica negativa para Wnt2; **B:** Imunoistoquímica positiva para Wnt2.

**Figura 14** - Imunoistoquímica para Wnt2 em carcinomas vulvares.

**Tabela 8** - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Wnt2 em CEC vulvar.

Parâmetros Clínico-patológicos	Expressão de Wnt2			p (value)
	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Profundidade de invasão				
Derme superficial / derme	72	34 (48)	38 (52)	0,861
Derme profunda / subcutâneo	45	22 (39)	23 (51)	
NA	03			
Infiltrado inflamatório				
Leve	31	13 (41)	18 (59)	0,378
Moderado / alto	86	44 (51)	42 (49)	
NA	03			
Invasão vascular				
Ausente	97	47 (48)	50 (52)	0,580
Presente	18	10 (56)	08 (14)	
NA	05			
Invasão perineural				
Ausente	100	48 (48)	52 (52)	0,358
Presente	13	8 (62)	05 (39)	
NA	07			
Metástase Linfonodal				
Ausente	39	16 (41)	23 (59)	0,390
Presente	25	13 (52)	12 (48)	
NA	56			
Estadiamento FIGO				
I / II	64	32 (50)	32 (50)	0,827
III / IV	48	23 (47)	25 (53)	
NA	08			
Recidiva				
Ausente	68	35 (52)	33 (49)	0,881
Presente	42	21 (50)	21 (50)	
NA	10			

**Legenda:**

**NA:** Não disponível

**Negativo:** scores 0 e 1+

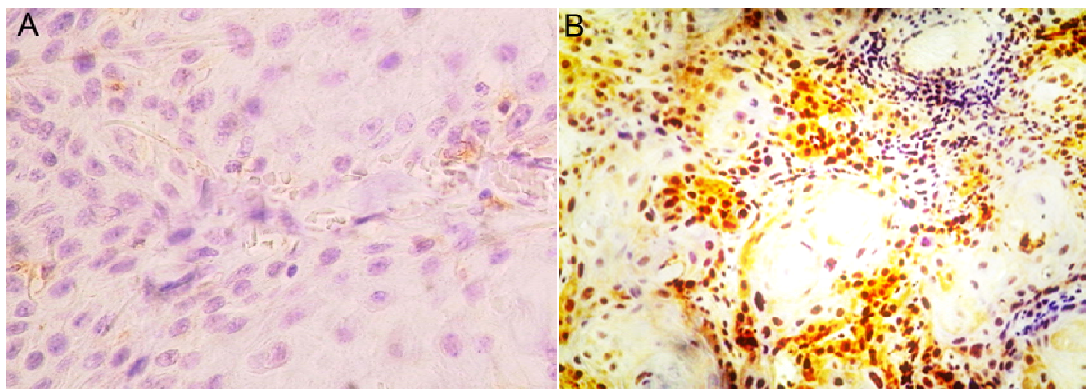
**Positivo:** scores 2+ e 3+

#### 4.3.4 Frizzled1

Foi observada marcação positiva para proteína Frizzled1 em 56 casos avaliados (49%) e em 61 casos (51%) a expressão foi ausente. A positividade e negatividade de imunistoquímica desta proteína no CEC de

vulva estão representados na Figura 15.

Foi observado que a expressão de Frizzled1 foi associada com profundidade de invasão ( $p=0,029$ ). Tumores que acometiam apenas a derme superficial/derme apresentaram 25% dos casos com expressão positiva de Frizzled, entretanto tumores com invasão profunda da derme/subcutâneo apresentaram quase o dobro de expressão desta proteína (45%) (Tabela 9). Essa mesma tendência pudemos observar em relação à metastase linfonodal, tumores metastático apresentaram 44% de positividade e tumores com ausência de metástase apresentaram 24% de positividade de Frizzled, entretanto a associação foi no limite da significância ( $p=0,07$ ) (Tabela 21).



**Legenda:** **A:** Imunoistoquímica negativa para Frizzled1; **B:** Imunoistoquímica positiva para Frizzled1.

**Figura 15** - Imunoistoquímica para Frizzled1 em carcinomas vulvares.

**Tabela 9** - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Frizzled1 em CEC vulvar

Parâmetros Clínico-Patológicos	Expressão de Frizzled1			p (value)
	Total(n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Profundidade de invasão				
Derme superficial / derme	72	18 (25)	54 (75)	0,029
Derme profunda / subcutâneo	45	20 (45)	25 (55)	
NA	03			
Infiltrado inflamatório				
Leve	31	07(23)	24 (77)	0,207
Moderado / alto	86	30(34)	56 (66)	
NA	03			
Invasão vascular				0,263
Ausente	97	30 (31)	67 (70)	
Presente	18	08 (44)	10 (55)	
NA	05			
Invasão perineural				
Ausente	100	31 (31)	69 (69)	0,587
Presente	13	05 (39)	08 (61)	
NA	07			
Metástase Linfonodal				
Ausente	39	09 (24)	30 (76)	0,078
Presente	25	11 (44)	14 (56)	
NA	56			
Estadiamento FIGO				
I / II	64	20 (32)	44 (68)	0,643
III / IV	48	17 (36)	31 (64)	
NA	08			
Recidiva				
Ausente	68	19 (28)	49 (72)	0,173
Presente	42	17 (41)	25 (59)	
NA	10			

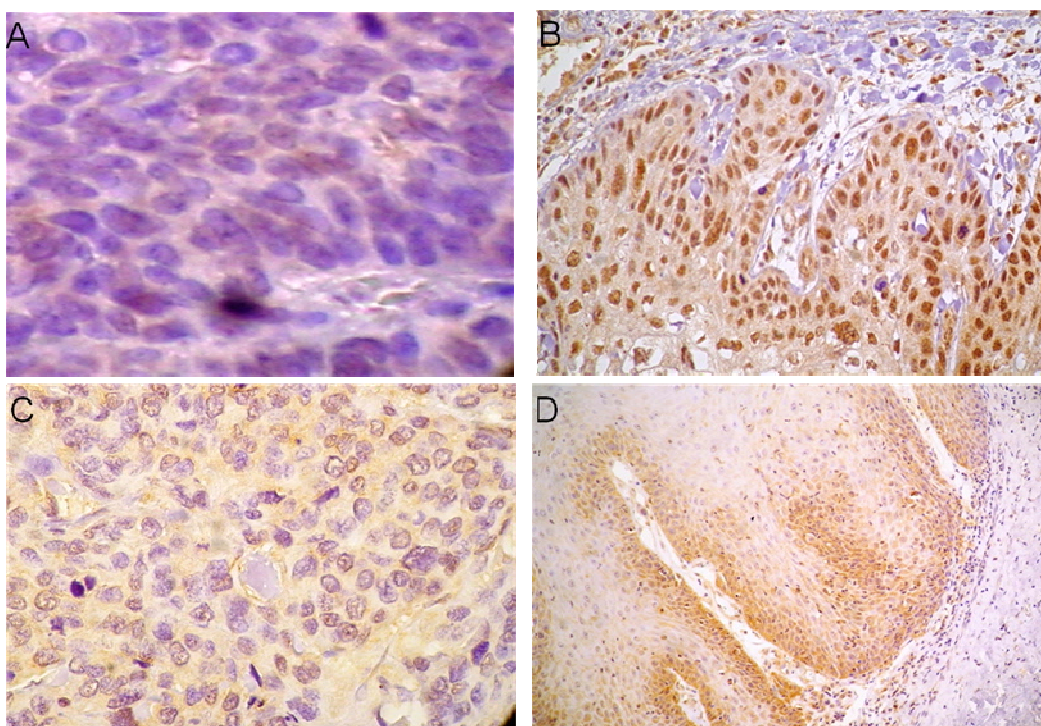
**Legenda:****NA:** Não disponível**Negativo:** scores 0 e 1+**Positivo:** scores 2+ e 3+**4.3.5 GSK3 $\beta$  fosforilada e não fosforilada**

Foi observada marcação positiva para proteína GSK3 $\beta$  fosforilada em 20 (17%) casos, já 83% (n=97) dos casos foram ausentes de marcação.

Para a proteína GSK3 $\beta$  não-fosforilado houve marcação positiva em

70% (n=77) e 30% (n=38) dos casos foram ausentes de marcação. A positividade e negatividade da reação de imunohistoquímica destas proteínas estão ilustradas na Figura 16.

Nestas análises não observamos associação entre a expressão de GSK3 $\beta$  fosforilada e não-fosforilada e os parâmetros clínicos-patológicos (Tabela 10) e nem com Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos (  $p=0,68$  e  $p=0,32$ , respectivamente).



**Legenda:** **A:** Imunoistoquímica negativa para GSK3 $\beta$  fosforilado; **B:** Imunoistoquímica positiva para GSK3 $\beta$  fosforilado; **C:** Imunoistoquímica negativa para GSK3 $\beta$  não fosforilado; **D:** Imunoistoquímica positiva para GSK3 $\beta$  não fosforilado.

**Figura 16** - Imunoistoquímica para GSK3 $\beta$  fosforilado e GSK3 $\beta$  não fosforilado em carcinomas vulvares.

**Tabela 10** - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Gsk3 $\beta$  fosforilada e não fosforilada em CEC vulvar

Parâmetros Clínico-patológicos	Expressão de Gsk3 $\beta$ fosforilada				Expressão de Gsk3 $\beta$ não fosforilada			
	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	p (value)	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	p (value)
Profundidade de invasão								
Derme superficial / derme	72	10 (14)	62 (86)	0,244	72	48 (67)	24 (33)	0,803
Derme profunda / subcutâneo	45	10 (23)	35 (77)		45	31 (69)	14 (31)	
NA	03				03			
Infiltrado inflamatório								
Leve	31	06 (20)	25 (80)	0,689	31	22 (71)	09 (29)	0,633
Moderado / alto	86	14 (17)	72 (83)		86	57 (67)	29 (33)	
NA	03				03			
Invasão vascular								
Ausente	97	16 (17)	81 (83)	0,556	97	63 (65)	34 (35)	0,288
Presente	18	04 (23)	14 (77)		18	14 (78)	04 (22)	
NA	05				05			
Invasão perineural								
Ausente	100	17 (17)	83 (83)	0,589	100	67 (67)	33 (33)	0,695
Presente	13	03 (24)	10 (76)		13	08 (62)	05 (38)	
NA	07				07			
Metástase Linfonodal								
Ausente	39	05 (13)	34 (87)	0,247	39	23 (59)	16 (41)	0,688
Presente	25	06 (24)	19 (76)		25	16 (64)	09 (36)	
NA	56				56			
Estadiamento FIGO								
I / II	64	09 (15)	55 (85)	0,504	64	41 (65)	23 (35)	0,451
III / IV	48	09 (19)	39 (81)		48	34 (71)	14 (29)	
NA	08				08			
Recidiva								
Ausente	68	11 (17)	57 (83)	0,946	68	44 (65)	24 (35)	0,205
Presente	42	07 (17)	35 (83)		42	32 (77)	10 (23)	
NA	10				10			

**Legenda:**

**NA:** Não disponível

**Negativo:** scores 0 e 1+

**Positivo:** scores 2+ e 3+



#### 4.3.6 $\beta$ -catenina

Em relação a expressão da proteína  $\beta$ -catenina foram avaliadas duas localizações celulares, o núcleo e o citoplasma.

Foi observada marcação citoplasmática positiva para a proteína  $\beta$ -catenina em 28% (n= 33) e 72% (n=86) dos casos foram ausentes de marcação citoplasmática. Em relação a marcação nuclear, foi observada o que 9 (8%) casos apresentaram expressão positiva e 110 casos (92) apresentaram ausência de marcação. A positividade e negatividade desta proteína em CEC de vulva estão ilustradas na **Figura 17**.

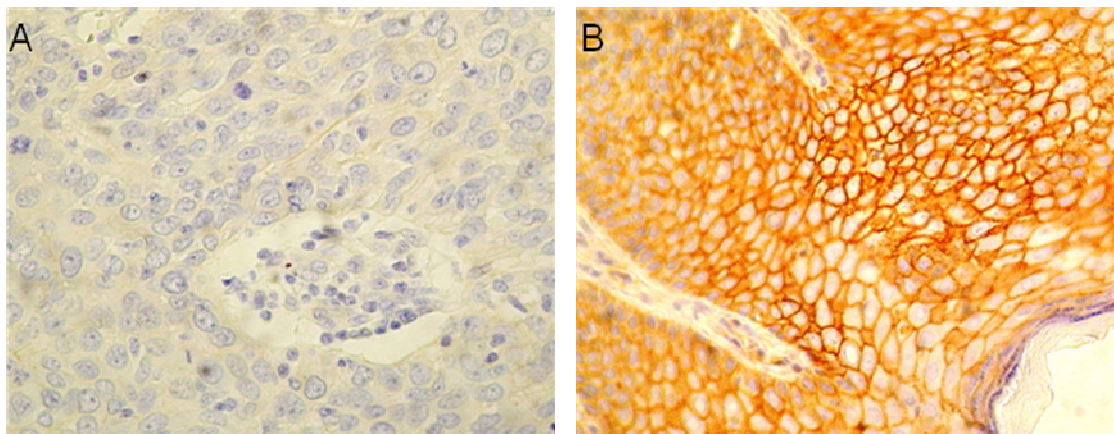
Foi observada associação entre a expressão citoplasmática de  $\beta$ -catenina e a profundidade de invasão. Tumores com maior profundidade de invasão apresentaram maior frequência de expressão de  $\beta$ -catenina (35%) em relação aos tumores superficiais (19%) (p=0,003). Na presença de invasão perineural também foi observado maior frequência de expressão desta proteína citoplasmática (54%) do que tumores com ausência de invasão perineural (20%) (p=0,007) (Tabela 11).

A  $\beta$ -catenina nuclear foi mais expressa em tumores com metástase linfonodal (16%) e nenhum dos tumores com ausência de metástase apresentou expressão de  $\beta$ -catenina (p=0,010). As outras variáveis clínico patológicas não apresentaram associação com expressão de  $\beta$ -catenina (Tabela 11).

A expressão citoplasmática da proteína  $\beta$ -catenina não foram associadas com Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos (p=0,98 e p=0,21, respectivamente). Entretanto, foi observada associação

entre Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos em relação à expressão nuclear de  $\beta$ -catenina ( $p=0,012$  e  $p=0,016$ , respectivamente).

Ao avaliarmos a Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos não pudemos relacionar com a expressão desta proteína.



**Legenda:** A: Imunoistoquímica negativa para  $\beta$ -catenina; B: Imunoistoquímica positiva para  $\beta$ -catenina.

**Figura 17** - Imunoistoquímica para  $\beta$ -catenina em carcinomas vulvares.

**Tabela 11 - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína  $\beta$ -Catenina no citoplasma e no núcleo de CEC vulvar**

Parâmetros Clínico-patológicos	Expressão de $\beta$ -Catenina citoplasma				Expressão de $\beta$ -Catenina núcleo			
	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	p value	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	p value
Profundidade de invasão								
Derme superficial / derme	72	13 (19)	59 (81)	0,033	72	06 (08)	66 (92)	0,417
Derme profunda / subcutâneo	45	16 (35)	29 (64)		45	02 (05)	43 (95)	
NA	03				03			
Infiltrado inflamatório								
Leve	31	09 (29)	22 (71)	0,523	31	03 (10)	28 (90)	0,465
Moderado / alto	86	20 (24)	66 (76)		86	05 (06)	81 (94)	
NA	03				03			
Invasão vascular	97	21 (22)	76 (78)	0,283	97	06 (07)	91 (93)	0,451
Ausente	18	06 (34)	12 (66)		18	02 (12)	16 (88)	
Presente	05				05			
NA								
Invasão perineural								
Ausente	100	20 (20)	80 (80)	0,007	100	06 (06)	94 (94)	0,215
Presente	13	07 (54)	06 (46)		13	02 (16)	11 (84)	
NA	07				07			
Metástase Linfonodal								
Ausente	39	07 (18)	32 (82)	0,343	39	0 ---	39 (100)	0,010
Presente	25	07 (28)	18 (72)		25	04 (16)	21 (84)	
NA	56				56			
Estadiamento FIGO								
I / II	64	15 (24)	49 (77)	0,659	64	02 (04)	62 (96)	0,226
III / IV	48	13 (28)	35 (72)		48	04 (09)	44 (41)	
NA	08				08			
Recidiva								
Ausente	68	18 (27)	50 (73)	0,756	68	04 (06)	64 (94)	0,802
Presente	42	10 (24)	32 (76)		42	02 (05)	40 (95)	
NA	10				10			

**Legenda:**

**NA:** Não disponível

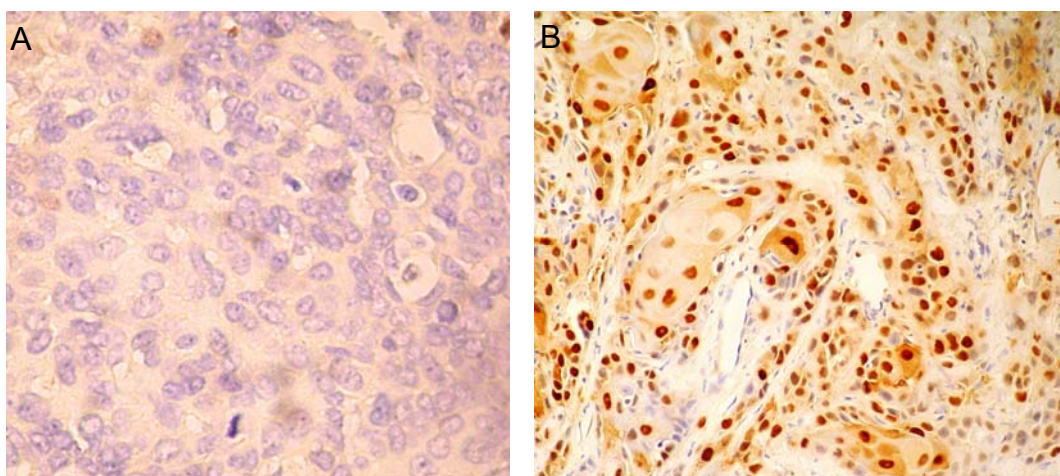
**Negativo:** scores 0 e 1+

**Positivo:** scores 2+ e 3+

#### 4.3.7 Ciclina D1

Foi observada marcação positiva para a proteína Ciclina D1 em 65% (n=77) e em 35% (n=49) dos casos apresentaram ausência de expressão. A positividade e negatividade desta proteína estão ilustradas na **Figura 18**.

A expressão da proteína Ciclina D1 não foi associada com Sobrevida Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos ( $p=0,72$  e  $p=0,16$ , respectivamente). Em relação aos parâmetros clínicos patológicos, pudemos observar que somente o estadiamento FIGO foi associado com a expressão da proteína Ciclina D1. Em estadiamento mais avançado III/IV a frequência de expressão de Ciclina D1 foi de 78% e em tumores iniciais I/II a frequência foi de 57% ( $p=0,022$ ) (Tabela 12).



**Legenda:** **A:** Imunoistoquímica negativa para CiclinaD1; **B:** Imunoistoquímica positiva para CiclinaD1.

**Figura 18** - Imunoistoquímica para ciclina D1 em carcinomas vulvares.

**Tabela 12** - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína Ciclinad1 em CEC vulvar

Parâmetros Clínico-patológicos	Total (n)	Expressão de Ciclinad1		p (value)
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Profundidade de invasão				
Derme superficial / derme	72	43 (60)	29 (40)	0,212
Derme profunda / subcutâneo	45	32 (72)	13 (28)	
NA	03			
Infiltrado inflamatório				
Leve	31	19 (61)	12 (39)	0,618
Moderado / alto	86	57 (66)	29 (34)	
NA	03			
Invasão vascular				
Ausente	97	60 (62)	37 (38)	0,195
Presente	18	14 (78)	04 (22)	
NA	05			
Invasão perineural				
Ausente	100	64 (64)	36 (36)	0,476
Presente	13	07 (54)	06 (46)	
NA	07			
Metástase Linfonodal				
Ausente	39	27 (70)	12 (30)	0,813
Presente	25	18 (72)	07 (28)	
NA	56			
Estadiamento FIGO				
I / II	64	36 (57)	28 (44)	0,022
III / IV	48	37 (78)	11 (23)	
NA	08			
Recidiva				
Ausente	68	45 (67)	23 (34)	0,839
Presente	42	27 (65)	15 (35)	
NA	10			

**Legenda:**

**NA:** Não disponível

**Negativo:** scores 0 e 1+

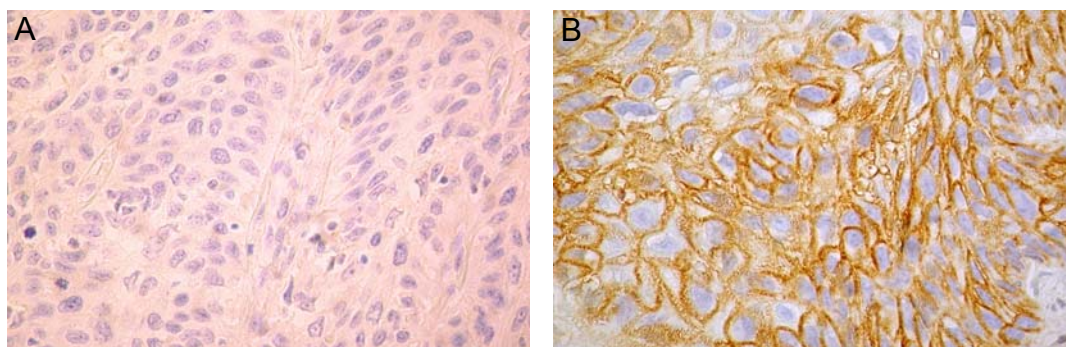
**Positivo:** scores 2+ e 3+

#### 4.3.8 CD44

Foi observada marcação positiva para a proteína CD44 em 27,3% (n=33) e 72,7% (n=86) casos foram ausentes de marcação. Imagens representativas das reações de CD44 em CEC de vulva são mostradas na

Figura 19.

A expressão da proteína CD44 não foi associada com Sobrevida Câncer Específica ( $p=0,81$ ) e Livre de Doença em 5 anos ( $p=1,23$ ). Não foi possível associação entre os parâmetros clínicos-patológicos e expressão da proteína CD44, com exceção de metástase linfonodal. Tumores com metástase linfonodal apresentaram maior frequência de expressão de CD44 (44%) do que tumores sem metástase linfonodal (21%) ( $p=0,045$ ). A mesma tendência de resultados foi observada em invasão vascular, porém no limite da significância ( $p=0,069$ ). A Tabela 13 mostra os resultados das análises de associações entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína CD44 em CEC vulvar.



**Legenda:** **A:** Imunoistoquímica negativa para CD44; **B:** Imunoistoquímica positiva para o CD44.

**Figura 19** - Imunoistoquímica para CD44 em carcinomas vulvares.

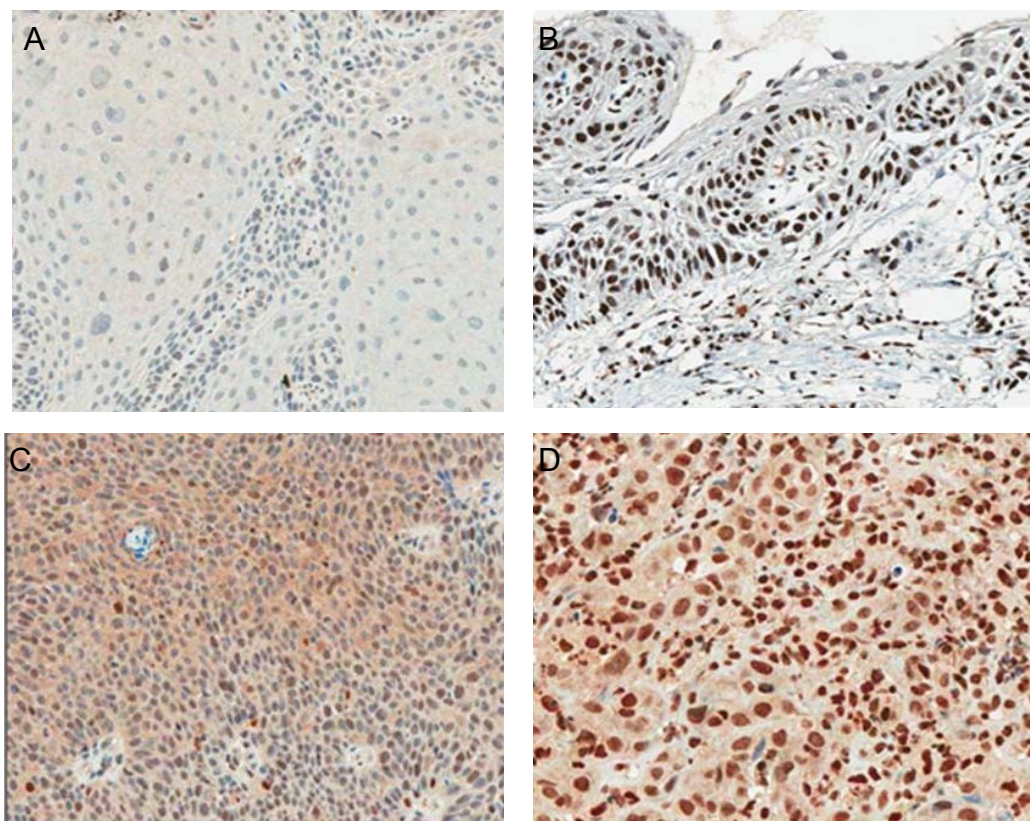
**Tabela 13** - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão da proteína CD44 em CEC vulvar

Parâmetros Clínico-patológicos	Expressão de CD44			p (value)
	Total(n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Profundidade de invasão				
Derme superficial / derme	72	21 (29)	51 (71)	0,770
Derme profunda / subcutâneo	45	12 (26)	33 (74)	
NA	03			
Infiltrado inflamatório				
Leve	31	07 (23)	24 (77)	0,354
Moderado / alto	86	27 (32)	59 (68)	
NA	03			
Invasão vascular				
Ausente	97	23 (24)	74 (76)	0,069
Presente	18	08 (45)	10 (55)	
NA	05			
Invasão perineural				
Presente	100	27 (27)	73 (73)	0,774
Ausente	13	04 (31)	09 (69)	
NA	07			
Metástase Linfonodal				
Ausente	39	08 (21)	31 (79)	0,045
Presente	25	11 (44)	14 (56)	
NA	56			
Estadiamento FIGO				
I / II	64	15 (24)	49 (76)	0,106
III / IV	48	18 (55)	30 (62)	
NA	08			
Recidiva				
Ausente	68	16 (24)	52 (76)	0,102
Presente	42	16 (39)	26 (61)	
NA	10			

**Legenda:****NA:** Não disponível**Negativo:** scores 0 e 1+**Positivo:** scores 2+ e 3+**4.3.9 CMYC**

Para a proteína CMYC foi avaliada a expressão no núcleo e no citoplasma. A positividade da proteína CMYC no citoplasma foi observada em 64,8% (n=77) e em 20,3% (n=42). Em relação a marcação nuclear foi

observado 24 (20%) casos positivos e 96 (80% dos casos negativos para CMYC. Oito casos demonstraram marcação exclusivamente nuclear. Imagens representativas das reações de CMYC em CEC de vulva são mostradas na Figura 20.



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

**Figura 20** - Imunoistoquímica para CMYC em carcinomas de vulva.



**Tabela 14 - Associação entre variáveis clínicas-patológicas e a expressão citoplasmática e nuclear da proteína CMYC em CEC vulvar**

Parâmetros Clínico-patológicos	Expressão de CMYC no citoplasma				Expressão de CMYC no núcleo			
	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	p (value)	Total (n)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	p (value)
Profundidade de invasão								
Derme superficial / derme	72	48 (67)	24 (33)	0,062	72	10 (14)	62 (86)	0,375
Derme profunda / subcutâneo	45	31 (39)	14 (31)		45	10 (23)	35 (77)	
NA	03				03			
Infiltrado inflamatório								
Leve	31	22 (71)	09 (29)	0,228	31	06 (20)	25 (80)	0,152
Moderado / alto	86	57 (67)	29 (33)		86	14 (17)	72 (83)	
NA	03				03			
Invasão vascular								
Ausente	97	63 (65)	34 (35)	0,129	97	16 (17)	81 (83)	0,556
Presente	18	14 (78)	04 (22)		18	04 (23)	14 (77)	
NA	05				05			
Invasão perineural								
Ausente	100	67 (67)	33 (33)	0,154	100	17 (17)	83 (83)	0,292
Presente	13	08 (62)	05 (38)		13	03 (24)	10 (76)	
NA	07				07			
Metástase Linfonodal								
Ausente	39	23 (59)	16 (41)	0,162	39	05 (13)	34 (87)	0,338
Presente	25	16 (64)	09 (36)		25	06 (24)	19 (76)	
NA	56				56			
Estadiamento FIGO								
I / II	64	41 (65)	23 (35)	0,568	64	09 (15)	55 (85)	0,447
III / IV	48	34 (71)	14 (29)		48	09 (19)	39 (81)	
NA	08				08			
Recidiva								
Ausente	68	44 (65)	24 (35)	0,604	68	11 (17)	57 (83)	0,105
Presente	42	32 (77)	10 (23)		42	07 (17)	35 (83)	
NA	10				10			

**Legenda:**

**NA:** Não disponível

**Negativo:** scores 0 e 1+

**Positivo:** scores 2+ e 3+

#### 4.4 GENOTIPAGEM DE HPV

A genotipagem de HPV foi realizada em 110 casos e os principais achados estão ilustrados na Tabela 15. Foi detectada positividade para o vírus em 40% das amostras avaliadas, sendo que, dentre os tipos infectantes mais comuns estavam o HPV 16 (35%), seguido do HPV 33 (23%). Oitenta e um por cento das pacientes apresentavam somente um tipo infectante de HPV. No entanto, infecção concomitante de dois tipos virais diferentes foi observada em 7% dos tumores e de três tipos virais em 12% (Tabela 16).

**Tabela 15** - Genotipagem de HPV em carcinomas vulvares e tipos infectantes

Genotipagem HPV	Resultados	
	N	%
<b>Positivo</b>	45	39,81
<b>Negativo</b>	65	60,19
<b>Tipos Infectantes</b>		
<i>HPV 16</i>	19	34,62
<i>HPV 18</i>	4	7,69
<i>HPV 33</i>	14	23,08
<i>HPV 35</i>	3	5,77
<i>HPV 42</i>	1	1,92
<i>HPV 45</i>	1	1,92
<i>HPV 53</i>	4	7,69
<i>HPV 54</i>	2	3,85
<i>HPV 67</i>	2	3,85
<i>HPV 69</i>	1	1,92
<i>HPV 71</i>	2	3,85
<i>HPV 82</i>	1	1,92
<i>HPV 84</i>	1	1,92

**Tabela 16** - Distinção entre quantidade de tipos de HPV infectantes em carcinomas vulvares.

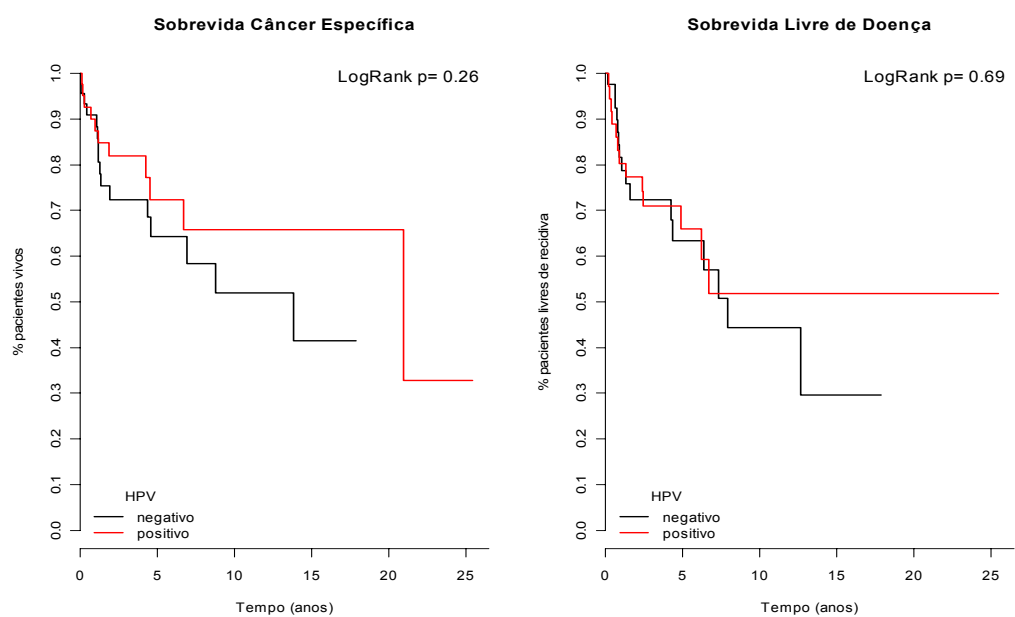
<b>Genotipagem HPV</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>1 tipo infectante</b>	37	80,49
<b>2 tipos infectantes</b>	3	7,32
<i>Tipos infectantes</i>		
16+33	2	66,66
42+54	1	33,33
<b>3 tipos infectantes</b>	5	12,20
<i>Subtipo</i>		
16+33+84	1	20
18+33+35	1	20
33+18+16	1	20
33+31+82	1	20
33+35+16	1	20

A distribuição dos dados epidemiológicos das pacientes do estudo em relação aos tipos de HPV infectantes mostrou uma média de idade menor das pacientes HPV positivo (66,3 anos) em relação às HPV negativo (72,6 anos), sendo que no primeiro grupo, a idade mínima foi de 15 anos, enquanto no segundo foi de 48 anos. Além disso, mulheres HPV positivo apresentaram médias de idade de coitarca menores do que as mulheres HPV negativo (19,9 do primeiro grupo com idade mínima de 11 anos versus 21,9 do segundo). Dentre as pacientes que relataram nenhum ou um parceiro durante a vida, a maior parte não estava infectada pelo vírus. Em relação ao estado civil, 54% das mulheres sem HPV eram casadas, sendo que 56% das mulheres com HPV eram solteiras. Outros dados relacionados à menopausa, etilismo, tabagismo, dentre outros estão disponíveis na Tabela 17.

Várias características anátomo-patológicas e clínicas abordadas,

quando comparadas à presença de infecção pelo HPV demonstraram, em sua maioria, padrão semelhante de distribuição entre grupos, independentemente da infecção pelo vírus, tais como, a invasão da derme superficial e porção média da derme, infiltrado inflamatório moderado, ausência de invasão vascular e perineural e estadiamento FIGO I ou II. Estas características estão ilustradas na Tabela 18.

Curvas de sobrevida para a presença de HPV dentre as amostras estão ilustradas na Figura 21, as quais não demonstraram valor de significância estatística em relação à presença ou ausência do vírus. A variação do n amostral dentre as variáveis anátomo-patológicas e clínicas se deve a dificuldades observadas na avaliação histopatológica, na qual alguns parâmetros não puderam ser avaliados e/ou da ausência de dados nos prontuários, como no caso do Estadiamento FIGO e presença de metástases linfonodais em que as lâminas das peças de linfonodos não estavam disponíveis.



**Figura 21** - Curvas de sobrevivência Câncer Específica e Livre de Doença em 5 anos para a presença de HPV entre os tumores

**Tabela 17** - Distribuição dos dados epidemiológicos das pacientes em relação aos tipos de HPVs infectantes em carcinomas vulvares.

<b>HPV vs Dados epidemiológicos</b>					
<b>Variáveis</b>	<b>Categoria</b>	<b>HPV</b>		<b>Total</b>	<b>P</b>
		<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>		
<b>Idade ao diagnóstico</b>	n	45	40	-	0.554
	média (desvio padrão)	72.6 (10.5)	66.3 (14.7)		
	Mediana	72.3	69		
	mínimo – máximo	48 - 99	15 - 90		
<b>Menopausa</b>	n	33	32	-	0.234
	média (desvio padrão)	49.8 (6.1)	50.5 (4.5)		
	mediana	51	50		
	mínimo - máximo	38 - 64	39 - 60		
<b>Coitarca</b>	n	17	11	-	0.423
	média (desvio padrão)	19.9 (3.7)	21.9 (8.1)		
	mediana	21	20		
	mínimo - máximo	15 - 26	nov/43		
<b>Número de parceiros</b>		<b>n(%)</b>			0.673
	Nenhum	2(67)	1(33)	3	
	1	18(58)	13(42)	31	
	2	1(100)	0	1	
	4	1(50)	1(50)	2	
<b>Raça</b>	Branca	38 (50)	38 (50)	76	0.789
	Não branca	9 (75)	3 (25)	12	
<b>Etilismo</b>	Não	42 (53)	37 (47)	79	0.809
	Sim, no passado	0 (00)	1 (1.00)	1	
<b>Tabagismo</b>	Não	37 (55)	30 (45)	67	0.552
	Sim, atualmente	1 (14)	6 (86)	7	
	Sim, no passado	5 (71)	2 (29)	7	
<b>Estado Civil</b>	Casadas/viúva/separadas	32 (54)	18 (44)	50	0.3093
	Solteiras	27 (46)	23 (56)	50	
<b>Escolaridade</b>	Analfabeto ou 1º grau	40 (75)	30 (77)	70	0.8719
	2º grau ou mais	13 (25)	9 (23)	22	

**Tabela 18** - Distribuição das variáveis anátomo-patológicas e clínicas em relação aos tipos de HPV infectantes em carcinomas vulvares.

<b>HPV vs Variáveis anátomo-patológicas e clínicas</b>					
<b>Variáveis</b>	<b>Categoria</b>	<b>HPV n(%)</b>			<b>p</b>
		<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total</b>	
<b>Profundidade da invasão</b>	Derme superficial ou derme	31 (52)	26 (62)	57	0.3054
	Derme profunda ou subcutâneo	29 (48)	16 (38)	45	
<b>Infiltrado inflamatório</b>	Leve (1+)	17 (29)	11 (26)	28	0.9138
	Moderado (2+)	36 (61)	28 (65)	64	
	Alto (3+)	6 (10)	4 (9)	10	
	Não	48 (80)	34 (85)	82	
<b>Invasão Vascular</b>	Sim	12 (20)	6 (15)	18	0.4287
	Não	49 (84)	36 (90)	85	
<b>Invasão Perineural</b>	Sim	9 (16)	4 (10)	13	0.4373
	Não	19 (59)	18 (69)	37	
<b>Metástase linfonodal</b>	Sim	13 (41)	8 (31)	21	0.1588
	Não	46 (81)	28 (68)	74	
<b>Lesões Associadas</b>	Sim	11 (19)	13 (32)	24	0.5344
	I ou II	37 (61)	28 (67)	65	
<b>Estadiamento FIGO</b>	III ou IV	24 (39)	14 (33)	38	

A Tabela 19 mostra a análise de associação entre as proteínas analisadas e presença ou ausência de HPV.

Pudemos observar alta frequência de expressão de proteínas da via WNT em tumores infectados pelo HPV, entretanto não foi possível mostrar associações entre eles. Apenas observamos uma associação entre Wnt2 e o tipo de HPV. Tumores com expressão positiva de Wnt2 apresentaram alta frequência de HPV de baixo risco (64%) ao passo que tumores que foram Wnt2 negativo apresentaram menor frequência de HPV de baixo risco (39%) ( $p=0,044$ ).

Ao avaliar a distribuição da expressão dos marcadores da via WNT em relação à infecção pelo HPV, pode-se inferir que 58% dos tumores Wnt1

positivos eram também HPV positivos, sendo, 55% de alto risco. Sessenta por cento dos tumores Wnt2 positivos eram HPV positivos, sendo, 36% de alto risco. Cinquenta e cinco por cento dos tumores Frizzled1 positivos eram HPV positivos, sendo, 53% de alto risco. Cinquenta e dois por cento dos tumores GSK3B fosforilado positivos eram HPV positivos, sendo, 56% de alto risco. Sessenta e quatro por cento dos tumores GSK3B não fosforilado positivos eram HPV positivos, sendo, 47% de alto risco. Cinquenta e oito por cento dos tumores Ciclina D1 positivos eram HPV positivos, sendo, 59% de alto risco. Sessenta por cento dos tumores CD44 positivos eram HPV positivos, sendo, 61% de alto risco. Quarenta e oito por cento dos tumores com marcação citoplasmática positiva para B-catenina eram HPV positivos, sendo, 47% de alto risco. Sessenta e dois por cento dos tumores com marcação nuclear positivos para B-catenina eram HPV positiva, sendo, 60% de alto risco. Sessenta e quatro por cento dos tumores CMYC positiva para marcação citoplasmática eram HPV positivos, sendo, 48% de alto risco, já 50% dos tumores que apresentaram marcação nuclear positiva para CMYC eram HPV positivos, sendo, 46% de alto risco (Tabela 44).



**Tabela 19** - Distribuição da expressão imunoistoquímica dos marcadores da via WNT em relação à positividade do HPV em carcinomas vulvares.

**Relação entre HPV e marcadores da via WNT**

Marcador	Categoria	HPV n(%)			P value	Tipos de HPV n(%)			P value
		Negativo	Positivo	Total		Baixo risco	Alto risco	Total	
<b>Wnt1</b>	Negativo	30(42)	42(58)	72	0,965	23(54)	19(46)	42	0,479
	Positivo	16(42)	22(58)	38		10(45)	12(55)	22	
<b>Wnt2</b>	Negativo	25(43)	33(57)	58	0,773	13(39)	20(61)	33	0,044
	Positivo	21(40)	31(60)	52		20(64)	11(36)	31	
<b>Frizzled1</b>	Negativo	31(40)	45(60)	76	0,744	24(53)	21(47)	45	0,663
	Positivo	15(45)	19(55)	34		9 (47)	10(53)	19	
<b>GSK3B fosforilado</b>	Negativo	38(41)	55(59)	93	0,634	29(53)	26(47)	55	0,645
	Positivo	8 (48)	9 (52)	17		4 (44)	5 (56)	9	
<b>GSK3B não fosforilado</b>	Negativo	19(54)	16(46)	35	0,070	8 (50)	8 (50)	16	0,885
	Positivo	27(36)	48(64)	75		25(52)	23(47)	48	
<b>Ciclina D1</b>	Negativo	17(43)	23(57)	40	0,913	17(42)	23(58)	40	0,913
	Positivo	29(42)	41(58)	70		29(41)	41(59)	70	
<b>CD44</b>	Negativo	34(42)	46(58)	80	0,813	26(56)	20(44)	46	0,204
	Positivo	12(40)	18(60)	30		7 (39)	11(61)	18	
<b>Bcatenina citoplasma</b>	Negativo	32(39)	51(61)	83	0,224	26(51)	25(49)	51	0,854
	Positivo	14(52)	13(48)	27		7 (53)	6 (47)	13	
<b>Bcatenina núcleo</b>	Negativo	43(42)	59(58)	102	0,797	31(52)	28(48)	59	0,590
	Positivo	3 (38)	5 (62)	8		2 (40)	3 (60)	5	
<b>CMYC citoplasma</b>	Negativo	19(54)	16(46)	35	0,280	8 (50)	8 (50)	16	0,221
	Positivo	27(36)	48(64)	75		25(52)	23(48)	48	
<b>CMYC núcleo</b>	Negativo	25(64)	14(36)	39	0,225	29(51)	26(49)	55	0,212
	Positivo	6 (50)	6 (50)	12		4 (44)	5 (46)	9	

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CASUÍSTICA DO ESTUDO**

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5.2 ASPECTOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS E CLÍNICOS DAS PACIENTES

As características anátomo-patológicas avaliadas pelo presente estudo mostraram uma tendência de melhor prognóstico dos tumores avaliados: grande parte das neoplasias pertenceu ao grupo de carcinomas epidermóides moderadamente diferenciados e bem diferenciados, sendo que tumores moderadamente a pouco diferenciados refletiram em uma pior sobrevida das pacientes em relação aos tumores mais bem diferenciados, dado que corrobora os achados de um trabalho realizado nesta instituição em 1999 (PINTO et al. 1999) que aponta que mulheres com tumores de padrão basalóide mostraram 3,5 vezes mais chance de morrer pelo câncer do que aquelas com tumores bem diferenciados do tipo ceratinizante [Risco Relativo = 3.5, 95%. Além disso, NICOLETTO et al. (2010) descrevem que tumores de graus histológico 1 ou 2 predizem melhor sobrevida livre de doença.

Em relação ao acometimento linfonodal, foi observado algum grau de acometimento em 28,3% das pacientes, sendo que dentre as mulheres que apresentaram linfonodos positivos, foram observadas sobrevidas menores do que entre aquelas sem nenhum acometimento linfonodal detectado. O acometimento de linfonodos é um dos principais fatores prognósticos do carcinoma de vulva estando, inclusive, incorporado ao estadiamento de neoplasias da FIGO (MOORE et al. 2009).

São escassos na literatura trabalhos no que se refere à análise

histopatológica de carcinomas de vulva, o que inviabiliza a comparação de muitos de nossos achados com os relatados por outros autores. Em nossa casuística, apenas uma pequena parcela das pacientes apresentou tumores com invasão vascular (15%) ou perineural (10,7%). LERMA et al. (1999) detectaram uma menor porcentagem de invasão vascular (4,3%) e maior de invasão perineural (21,4%). Entretanto, este estudo contemplou um número menor de casos, e fatores como a experiência do patologista e o número de lâminas analisadas para cada caso influenciam no resultado anátomo-patológico. Finalmente, entre os tumores analisados pelo nosso estudo, infiltrado inflamatório moderado foi observado em número maior de casos (62% dos casos) que o estudo previamente citado, em que foi detectado em 35,3% (PINTO et al. 1999). A densidade do infiltrado parece estar associada com melhor sobrevida em carcinoma de vulva: pacientes com infiltração plasmolinfocítica moderada a severa parecem apresentar melhor sobrevida em relação às que tiveram infiltrado leve ou nenhum infiltrado. Entretanto, o papel exato dos fatores imunológicos envolvidos na resposta inflamatória requer maiores estudos (ANDREASSON et al. 1982; HOMESLEY et al. 1993; PINTO et al. 1999).

Dados os sintomas apresentados pelas pacientes, o mais comumente relatado foi o prurido, como também mostrado por outros autores (DE HULLU et al. 2006; LANNEAU et al. 2009) e a maior parte das pacientes apresentaram sintomas por cerca de 6 meses (LANNEAU et al. 2009), sendo que houve pacientes que apresentaram sintomas por até 10 anos, o que reflete a falta de informação e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde

como resultado dos fatores abordados anteriormente. Deste modo, como proposto por JOURA et al. (2000), o aumento da incidência da neoplasia vulvar, principalmente em mulheres jovens, torna aumentada a demanda por cuidados em relação à sintomatologia destas pacientes. Muitas mulheres com câncer invasivo possuem um longo histórico de sintomas vulvares e passam por investigação e tratamento inadequados das lesões precursoras. Desta forma, o exame cuidadoso da vulva, bem como o encorajamento ao auto-exame podem facilitar a detecção precoce não somente dos carcinomas invasivos, como também das lesões precursoras, permitindo aumento das taxas de sobrevida das pacientes, bem como um manejo mais conservador desta neoplasia, permitindo preservação anatômica e da função sexual das pacientes.

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

A ocorrência de tumores em estádios precoces parece ter influenciado diretamente no tratamento de escolha para a maioria das

pacientes: vulvectomy radical tripla-incisão foi realizada em 57,27% das pacientes, como recomendado pela FIGO em relação ao estágio ao diagnóstico e tamanho do tumor. De acordo com as recomendações da FIGO, carcinomas *in situ* (Estadio FIGO 0) e IA ( $\leq 2$ cm) devem ser tratados com ressecção local ampla; IB (invasão estromal  $>1,0$ cm) e II ( $>2$  cm) com vulvectomy parcial e linfadenectomia; e III (qualquer tamanho com disseminação adjacente) e IVA (tumor invadindo outros órgãos) devem ser tratadas com vulvectomy radical (*en bloc*) e linfadenectomia (SCHEISTRØEN et al. 2002).

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

Apesar da vulvectomy radical tripla incisão ter sido introduzida visando reduzir as taxas de morbidade e mortalidade comparadas às da vulvectomy radical clássica (*en bloc*), complicações e recorrências ainda são motivo de preocupação na decisão clínica (PODRATZ et al. 1983; ANDERSEN e HACKER 1983; MOORE et al. 2009). Dentre nossa casuística, 54,5% das pacientes apresentaram complicações da cirurgia, sendo deiscência da ferida a mais comum, seguida de infecção e necrose do



retalho. Além disso, problemas psicosexuais, não avaliados no presente projeto, são amplamente descritos na literatura, principalmente entre as pacientes mais jovens: medo, distorção da imagem corporal e depressão estão entre os mais citados (DE HULLU e VAN DER ZEE 2006).

De acordo com COULTER e GLEASON (2003), o carcinoma vulvar apresenta recorrência em um terço das pacientes, dado semelhante ao obtido pelo nosso estudo: 38,58% das pacientes apresentaram algum tipo de recidiva (local, linfonodal, à distância ou locorregional + à distância). Dentre estas pacientes, as taxas de sobrevida câncer específica foram menores do que aquelas que não apresentaram qualquer recidiva. O tamanho da lesão, margens de ressecção menores de 1 cm e status dos linfonodos no momento da cirurgia são os maiores preditores de recorrência em carcinomas de vulva (COULTER e GLEASON 2003). Em relação ao tipo de recorrência, nossos dados são similares aos apresentados por outros autores, com exceção da recorrência local que foi observada em menor porcentagem do que a observada na literatura: 41,30% da nossa casuística versus 53-86% da literatura, como descrito por PIURA et al. (1993); MAGGINO et al. (2000) e COULTER e GLEASON (2003). Já a recidiva linfonodal foi observada em 26,08%, sendo relatada na literatura entre 11-38% (PREMPREE e AMORNMARN 1984; BRANDENBERGER et al. 1992; PIURA et al. 1993; MAGGINO et al. 2000). É sabido que o risco de metástase em linfonodo em tumores primários parece estar relacionado à profundidade de invasão e tamanho do tumor, bem como invasão do espaço vascular (COULTER e GLEASON 2003). Recidiva à distância foi observada

em 10,86% (variando de 8-37%, de acordo com PREMPREE e AMORNMARN 1984; MAGGINO et al. 2000).

A partir do exposto acima, é importante que, em carcinomas de vulva, tanto a seleção cuidadosa das pacientes que podem ser submetidas a cirurgias menos radicais para evitar tratamento desnecessário, quanto o tratamento individualizado de modo a evitar tratamento negligenciado, devem ser rigorosamente avaliados. Além disso, um tempo maior de acompanhamento das pacientes é importante após a cirurgia visto que recorrências podem ser vistas vários anos após a terapia primária (SCHEISTRØEN et al. 2002).

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

### 5.3 INFECÇÃO POR HPV

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

Dentre os tumores em que foi detectada infecção pelo HPV, a maior parte pertenceu aos tipos histológicos não ceratinizantes tipo CEC3 ou basalóide, ao passo que dentre os tumores HPV negativos eram mais frequentes os carcinomas bem diferenciados (CEC 1), resultado semelhante aos dados já bem mostrados na literatura (HORDING et al. 1994; MESSING e GALLUP 1995; TRIMBLE et al. 1996; JONES et al. 1997; HAMPL et al. 2006). No primeiro grupo, a via etiopatogênica do tumor é dependente da infecção pelo HPV, na qual um estágio pré-maligno é observado através de presença de VINs clássicas, geralmente associada com idade mais jovem das pacientes e tem sido relatada como tendo um melhor prognóstico em

relação aos tumores do grupo HPV negativo; já no segundo grupo, via é caracterizada por tumores HPV negativos, acometendo em sua maioria mulheres mais velhas e é, geralmente, acompanhada de lesões (VINs) diferenciadas ou líquen escleroso e mutações em p53 (VAN DER AVOORT et al. 2006; HAMPL et al. 2006; LANNEAU et al. 2009).

Dentre a nossa casuística, mulheres com a infecção por HPV demonstraram uma média de idade e de coitarca menores em relação aquelas sem a infecção, corroborando dados previamente descritos na literatura. Entretanto, pelo agrupamento homogêneo das pacientes entre as distribuições das características de interesse, não houve diferença estatisticamente significativa de quaisquer dados com a infecção do HPV, bem como em relação à sobrevida; no entanto, houve uma tendência de pior sobrevida câncer específica das pacientes HPV negativas em relação às que tinham infecção pelo vírus, sendo assim a presença do HPV se demonstrou um fator protetor de melhor prognóstico em carcinomas vulvares como é relatado em CEC de boca (SCHWARTZ et al. 2001).

#### **5.4 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DO WNT**

Sabe-se que a via do WNT (conhecida como Wingless Type), tem papel importante no desenvolvimento e nos processos homeostáticos de diversas espécies, e quando ativa de maneira aberrante está associada à carcinogênese em diversos tipos de tumores (DOUCAS et al. 2006; GORDON e NUSSE 2006; MIKELS e NUSSE 2006).

Em neoplasias vulvares ainda não se sabe se a mesma se encontra ativa e/ou alterada, desta forma estudamos em carcinoma vulvar os marcadores comumente estudados em outros tipos de neoplasias e associamos os achados com a presença e ausência do HPV.

Dentre os marcadores da via do WNT avaliados neste estudo, não houve correlação estatística entre a presença do HPV e a expressão destas proteínas. Existe apenas um relato relevante na literatura, de um estudo em CEC de orofaringe *in vitro* que avaliou o papel do HPV, mais especificamente a atuação dos oncogenes E6 e E7 no acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleo que é uma característica da ativação da via canônica do WNT (RAMPIAS et al. 2009). No entanto neste estudo foram utilizadas culturas de células de CEC de orofaringe e cultura de células com HPV 16 e 18 integradas, e apesar de ter demonstrado o envolvimento dos oncogenes E6 e E7 na regulação da  $\beta$ -catenina *in vitro*, podemos ver que o mesmo não acontece em CEC de vulva *in vivo*.

Ao avaliarmos os marcadores da via do WNT observamos que a expressão positiva de Frizzled1 foi de 25% nos casos que acometiam a derme superficial/derme e os com invasão profunda da derme/subcutâneo apresentaram quase o dobro de expressão desta proteína (45%), ainda observamos que os tumores com metástase linfonodal apresentaram 44% de positividade para Frizzled1 ao passo que os tumores com ausência de metástase linfonodal apresentaram 24% de positividade de Frizzled1. Desta forma sugerimos que o aumento da expressão do Frizzled1 pode estar associado ao aumento de invasão e conseqüentemente ao aumento de

metástase linfonodal em carcinoma de vulva apresentando pior prognóstico.

A avaliarmos a  $\beta$ -catenina citoplasmática observamos que os tumores com maior profundidade de invasão apresentaram maior frequência de expressão de  $\beta$ -catenina citoplasmática de (35%) em relação aos tumores superficiais (19%) ( $p=0,003$ ), já os casos que apresentavam invasão perineural apresentaram (54%) de marcação e os com ausência de invasão perineural (20%) ( $p=0,007$ ), sugerindo que o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma está associado ao aumento de invasão em carcinoma de vulva sendo assim estes casos de pior prognóstico.

A  $\beta$ -catenina nuclear foi mais expressa em (16%) dos tumores com metástase linfonodal e nenhum dos tumores com ausência de metástase apresentou expressão de  $\beta$ -catenina ( $p=0,010$ ), dado importante que nos leva a sugerir este marcador como marcador de pior prognóstico e para identificar metástases linfonodais.

A expressão de Ciclina D1 foi de 78% dos casos com estadiamento mais avançado III/IV, já os casos iniciais I/II a frequência foi de apenas 57% ( $p=0,022$ ), se apresentando como marcador de pior prognóstico.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo é inédito na avaliação de marcadores da via WNT em carcinomas vulvares e na associação dos achados com a presença e ausência de HPV, com uma casuística alta por se tratar de um tumor raro e de grande importância epidemiológica pela sua ascensão nos últimos anos.

Observamos o aumento da incidência do carcinoma de vulva com o aumento da idade; predominância de pacientes da raça branca em relação à não branca; baixo nível educacional como um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença; positividade de HPV em cerca de 40% das amostras, dados semelhantes ao citado na literatura.

Observamos que a presença do HPV se mostrou como fator de melhor prognóstico.

Dado importante e inédito, observado ao avaliar os marcadores da via WNT foi que em carcinomas vulvares a presença do HPV parece não ter envolvimento na regulação desta via.

Após avaliarmos a expressão dos marcadores da via do WNT, sugerimos neste trabalho que o aumento da expressão do Frizzled1 esta associada ao aumento de invasão e conseqüentemente ao aumento de metástase em carcinoma de vulva apresentando pior prognóstico.

Observamos que o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma esta associado ao aumento de invasão em carcinoma de vulva sendo assim estes casos de pior prognóstico.

A  $\beta$ -catenina nuclear foi mais expressa apenas em tumores com metástase linfonodal, dado importante que nos leva a sugerir este marcador como marcador de pior prognóstico para identificar metástases linfonodais.

A Ciclina D1 foi mais expressa nos casos com estadiamento mais avançado III/IV, podendo ser usado como marcador de confirmação de estadiamento e de pior prognóstico.

Concluimos que a via do WNT se encontra ativa em carcinomas de vulva.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. **J Biol Chem** 1999; 274:16180-7.

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

Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. **Int J Dev Biol** 2004; 48:477-87.

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

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; 105:418-9.

Cell Signaling Technology. **Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling**. 2010. [documento da internet]. Available from: [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt\\_beta\\_Catenin.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt_beta_Catenin.html) [2012 set 24]

Chen Y, Stump RJ, Lovicu FJ, Shimono A, McAvoy JW. Wnt signaling is required for organization of the lens fiber cell cytoskeleton and development of lens three-dimensional architecture. **Dev Biol** 2008; 324:161-76.

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

Crum CP, Pinto AP, Grantner SR, Peters WA. Squamous neoplasia of the vulva. In: Crum C, Lee K, editors. **Diagnostic gynecologic and obstetric pathology**. Philadelphia: Saunders; 2005. p.94-134.

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

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

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

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

Doucas H, Garcea G, Neal CP, Manson MM, Berry DP. Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance. **Eur J Cancer** 2006; 41:365-79.

Finch PW, He X, Kelley MJ, et al. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:6770-5.

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

Fristachi CE. Câncer de vulva: algumas considerações sobre o tratamento cirúrgico. **Prat Hosp** 2004; 6:73-5.

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

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

Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. **J Biol Chem** 2006; 281:22429-33.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.432-52; Aparelho reprodutor feminino.

Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. **J Cell Sci** 2003; 116:2627-34.

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

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

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

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

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

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Ann Rev Cell Dev Biol** 2004; 20:781-810.

Madretsma GS, Donze GJ, van Dijk AP, et al. Nicotine inhibits the in vitro production of interleukin 2 and tumour necrosis factor- $\alpha$  by human mononuclear cells. **Immunopharmacology** 1996; 35:47–51.

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

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

Martins NV. Câncer de vulva. In: Lima GR, Gebrim LH, Oliveira VC, Martins NV. **Ginecologia oncológica**. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 266-82.

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

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

Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. **Oncogene** 2006; 25:7461-8.

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

Moore DH, Koh Wui-jin, Mcguire WP, Wilkinson EJ. Vulva. In: Barakat RR, Markman M, Randall ME, editors. **Principles and practice of gynecologic oncology**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.555-90.

[NCI] National Cancer Institute. **Cancer facts and figures 2005**. Disponível em: <http://www.nci.nih.gov/cancertopics/pdq/vulvar>. [2011 jun 06].

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

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

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. **Cancer incidence in five continents vol VI**. Lyon: IARC; 1992.

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

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

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

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

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

Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:412-23.

Rampias T, Boutati E, Pectasides E, et al. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. **Mol Cancer Res** 2010; 8:433-43.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Câncer de vulva. In: Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. **Robbins & Cotran - fundamentos de patologia: base patológicas das doenças**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

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

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

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

Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2001; 125:1-9.

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

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



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

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

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

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