Paulo Henrique Zanvettor

Versão corrigida

**Estudo de fatores prognósticos clínicos e
biomoleculares de pacientes portadores de câncer de
vulva submetidos a tratamento cirúrgico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Versão original na Biblioteca de Teses e
Dissertações da USP

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zanvettor, Paulo Henrique

Estudo de fatores prognósticos clínicos e biomoleculares de pacientes portadores de
câncer de vulva submetidos a tratamento cirúrgico / . -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1.Neoplasias da vulva/patologia 2.Carcinoma de células
escamosas/epidemiologia 3.Proteína supressora de tumor p53 4.Metaloproteinase 2 da
matriz 5.Imunoistoquímica 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-365/13

Aos meus pais, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho de meu crescimento pessoal e profissional. Á minha esposa e meus filhos que me inspiram e me fazem querer continuar e melhorar sempre. Aos meus pacientes que me ensinam e me guiam na direção correta para que esse crescimento continue indeterminadamente.

Agradecimentos

A Deus e à minha família, pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso teria sido possível.

Aos pacientes e acompanhantes do Hospital Aristides Maltez, que humildemente possibilitaram a realização deste trabalho.

À diretoria do Hospital Aristides Maltez, pelo apoio ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, orientador deste trabalho, exemplo de saber, meu muito obrigado pela disponibilidade na preparação desta dissertação e pela confecção dos Tissue Microarray no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo.

Ao grande amigo Dr. Deraldo F. Filho, pelo grande desprendimento, conhecimento e disposição em ajudar, qualidades estas que foram cruciais para que este estudo fosse concretizado.

À amiga Enfermeira Lícia Lima pela preciosa colaboração, pelo conhecimento e companheirismo desde o início do meu trabalho sem a qual este estudo não se realizaria.

Ao amigo Dr. Fernando Filardi que com dedicação e paciência preencheu minhas eventuais ausências na prática clínica e cirúrgica possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Helenemarie Schaer-Barbosa, Diretora do Departamento de Anatomia Patológica do HAM por eficiência ímpar e inestimável ajuda na realização deste estudo.

À Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo pela presteza nas avaliações do material de anatomia patológica e paciência na transmissão de conhecimentos para a realização deste estudo.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica e Arquivo (SAME) do Hospital Aristides Maltez pela preparação técnica das lâminas e pela paciência e trabalho na separação dos prontuários.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação: 2011. Disponível online: http://www.fm.usp.br/gdc/docs/biblioteca_217_manual_completo_2012.pdf

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas	xi
Lista de gráficos.....	xii
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....	xiv
Resumo	xvi
Summary.....	xviii
1 - INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Fatores clínicos e patológicos que influenciam no prognóstico do câncer de vulva.....	23
1.1.1 Fatores Clínicos.....	23
1.1.2 Tamanho do Tumor	25
1.1.3 Profundidade de invasão	26
1.1.4 Metástases em linfonodos	28
1.2 Fatores moleculares	28
1.2.1 <i>p53</i>	28
1.2.3 Metaloproteinase	30
2 – OBJETIVOS.....	35
3 – MÉTODOS	37
3.1 Casuística	37
3.1.1 Critérios de inclusão	37
3.1.2 Características clínicas	38
3.2 Tratamentos realizados	41
3.3 Anatomia patológica.....	42
3.3.1 Revisão de Lâmina	42
3.3.2 Avaliação de anatomia patológica para microscopia em hematoxilina e eosina:.....	43

3.3.3 Construção do TMA:.....	44
3.3.4 Anticorpos Primários:.....	46
3.3.5 Ensaio imunohistoquímico nos TMAs:	46
3.4 Avaliação das Imunoexpressões.....	47
3.5 Análise estatística descritiva e de associação de fatores prognósticos relacionados à sobrevida	48
4 – RESULTADOS.....	52
4.1 Características clínicas e descritivas da amostra.....	52
4.2 Características de anatomia patológica descritivas da amostra	54
4.3 Resultados da expressão dos marcadores moleculares da amostra	55
4.4 Análise univariada comparativa de sobrevida global por câncer de acordo com as variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares dos carcinomas escamocelulares de vulva.....	56
4.4.1 Tempo de seguimento e sobrevida global da amostra	56
4.4.2 Análise das variáveis clínicas	57
4.4.3 Análise das variáveis anatomopatológicas	64
4.4.4 Análise das variáveis moleculares	67
4.5 Análise multivariada comparativa de sobrevida global por câncer de acordo com as variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares dos carcinomas escamocelulares de vulva.....	70
5 DISCUSSÃO	73
5.1 Fatores prognósticos clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e biomoleculares das pacientes portadores de câncer de vulva – análise univariada	73
5.1.1 Fatores clínicos e epidemiológicos	73
5.1.2 Fatores de anatomia patológica.....	78
5.1.3 Fatores moleculares	79
5.2 Fatores prognósticos clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e biomoleculares das pacientes portadoras de câncer de vulva – análise multivariada.....	82
6 CONCLUSÕES.....	85
7 ANEXOS	87

Anexo A - ficha de avaliação dos casos:	87
Anexo B –Microfotografias.	88
Anexo C – Comitê de ética em pesquisa	90
REFERÊNCIAS	97

Lista de figuras

Figura 1 – Aspecto do câncer de Vulva Invasor em região de fúrcula.....	20
Figura 2 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo anti-p53.....	30
Figura 3 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-MMP 2 negativo, inflamatório positivo.	32
Figura 4 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-MMP 2 positivo.	33
Figura 5 – Técnica de Confecção de TMA.	45
Figura 6 – Microfotografia. Exemplos de TMA.....	45
 Quadro 1 – Estadiamento conforme critérios da FIGO-Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia 2009.....	 24

Lista de tabelas

Tabela 1 – Índices de sobrevida em cinco anos para câncer de vulva conforme infiltração do câncer em linfonodos	27
Tabela 2 – Carcinoma vulvar invasor: Frequência de metástase em linfonodos, com a profundidade de invasão do tumor de 5 milímetros ou menos	27
Tabela 3 – Especificação técnica dos anticorpos utilizados	46
Tabela 4 – Características clínicas da amostra e resultados	52
Tabela 5 – Características encontradas no exame físico	53
Tabela 6 – Tratamentos realizados.....	53
Tabela 7 – Distribuição dos casos por grupos de estádios de acordo com o Estadiamento FIGO 2009	54
Tabela 8 – Resultados das expressões imunohistoquímicas	55
Tabela 9 – Características clínicas das pacientes-análise univariada	57
Tabela 10 – Características do tumor ao exame físico-análise univariada	60
Tabela 11 – Estadiamento por grupos conforme o estadiamento FIGO 2009-análise univariada	62
Tabela 12 – Avaliações de anatomia patológica-análise univariada.....	69
Tabela 13 – Expressões das moléculas p53 e MMP2-análise univariada	67
Tabela 14 – Variáveis independentes relacionadas com o óbito na análise multivariada (modelo de Cox).....	70

Lista de gráficos

- Gráfico 1** – Sobrevida global das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011, conforme a idade, baseado na idade mediana (n=75) 56
- Gráfico 2** – Curva de sobrevida conforme classificação do tumor em mediano ou lateral das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)..... 59
- Gráfico 3** – Curva de sobrevida conforme presença de forte suspeita de infiltração em linfonodos ao exame físico das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75) 60
- Gráfico 4** – Curva de sobrevida conforme estado do linfonodo retirado na linfonodectomia quanto à infiltração neoplásica presente ou ausente e comparado à linfonodectomia não realizada das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75) 61
- Gráfico 5** – Curva de sobrevida por grupos I, II e III conforme o estadiamento com critérios da FIGO 2009 das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)..... 62
- Gráfico 6** – Curva de sobrevida conforme critérios da FIGO 2009 e classificados em duas categorias, uma com estádios I e II e a outra com o estágio III das pacientes portadoras de carcinoma

escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75) 63

Gráfico 7 – Curva de sobrevida conforme tamanho do tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75) 65

Gráfico 8 – Curva de sobrevida conforme a profundidade de invasão do tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)..... 65

Gráfico 9 – Curva de sobrevida conforme profundidade de invasão do tumor e agrupados em profundidade de invasão de até 2mm e maior de 2 mm das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)..... 66

Gráfico 10 – Curva de sobrevida conforme expressão de MMP-2 nas amostras de tumor e agrupados em duas categorias, com expressão de até 50% e acima de 50% das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75) 68

Gráfico 11 – Curva de sobrevida conforme expressão de MMP-2 nas amostras de tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)..... 69

Gráfico 12 – Curva de sobrevida conforme a contagem de pontos dos fatores independentes relacionados ao óbito das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 pela análise multivariada (n=75)..... 71

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

n	Número de casos
%	Porcentagem
/	Por
+	Positivo
+/-	Mais ou Menos
=	Igual
°C	Grau Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AZ	Arizona
BA	Estado da Bahia
CEC	Carcinoma escamocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGA	Campo de grande aumento
cGY	CentiGray
Cm	Centímetro
DAB	Diaminobenzidina
DP	Desvio padrão
DAKO	Dako Protein Block Serum-Free
EC	Estádio clínico
EP	Erro padrão
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
H₂O₂	Água oxigenada
HAM	Hospital Aristides Maltez em Salvador – Estado da Bahia
HE	Hematoxilina eosina
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>

IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KD	Kilodalton
M	Classificação M (metástase distante)
μl	Microlitro
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinase de matriz
N	Classificação N (metástase linfonodal)
NCI	Instituto Nacional do Câncer (Estados Unidos da América)
NJ	New Jersey
p	Valor estatístico de p
PBS	Phosphat buffer solution
PET	Positron Electron Tomography
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
T	Classificação T (tumor primário)
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinase
TMA	Tissue Microarray (Arranjo em matriz de amostras teciduais)
TNM	Classificação de tumor, linfonodo e metástase
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial vascular
x	Vezes
X	Versus
Zn	Zinco

Resumo

Zanvettor, Paulo Henrique. Estudo de fatores prognósticos clínicos e biomoleculares de pacientes portadores de câncer de vulva submetidos a tratamento cirúrgico. 2013. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: O câncer de vulva representa entre 3 a 5% dos cânceres do trato genital feminino e aproximadamente 0,6% dos cânceres da mulher. Existem poucos estudos na literatura sobre fatores prognósticos incluindo avaliação molecular, relacionados a esta doença. Este estudo foi realizado para avaliar fatores prognósticos clínicos, epidemiológicos, patológicos e moleculares de pacientes portadores de câncer de vulva submetidos a tratamento cirúrgico. Avaliamos também uma classificação de prognóstico com base na pontuação do risco relativo dos fatores encontrados. **MÉTODOS:** Foram selecionadas as pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva, submetidas a tratamento cirúrgico no Departamento de Cirurgia Pélvica e Serviço de Ginecologia do Hospital Aristides Maltez entre o período de Junho de 1993 e Junho de 2011. Avaliamos as características clínicas, epidemiológicas, de anatomia patológica e molecular, em relação ao prognóstico das pacientes. A avaliação molecular estudou a expressão da proteína *p53* e metaloproteinase 2 de matriz por exame de imunohistoquímica pela técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA). Com base no banco de dados realizado através de consulta aos prontuários e com os resultados de anatomia patológica e testes imunohistoquímicos realizamos análise estatística em relação à sobrevida global das pacientes. **RESULTADOS:** Setenta e cinco pacientes foram elegíveis para o estudo. A análise univariada mostra como fatores relacionados à sobrevida foram a presença de linfonodo suspeito de metástase ao exame clínico ($p=0,004$), o tamanho maior de 4 centímetros ($p=0,001$), a presença de linfonodo com metástase ($p=0,026$), o estadiamento por grupos ($p=0,001$), a localização mediana ($p=0,011$), a profundidade de infiltração maior de 2 milímetros ($p=0,012$), a expressão da MMP 2 em mais de 50% das células ($p=0,009$). Na análise multivariada os fatores relacionados à sobrevida foram o tamanho maior de 4 centímetros ($p=0,014$), a profundidade de invasão maior de 2 milímetros ($p=0,023$) e a expressão de MMP2 em mais de 50% das células ($p=0,046$). De acordo ao risco relativo dos fatores identificados como relacionados ao prognóstico pela análise multivariada, foi elaborada a contagem de pontos para uma classificação prognóstica. Essa pontuação classifica em três categorias conforme a presença ou ausência dos fatores identificados na análise multivariada e pode corresponder a três expectativas de sobrevida. **CONCLUSÕES:** Os fatores tamanho maior de 4 centímetros, profundidade de invasão maior de 2 milímetros e expressão em mais de 50% das células tumorais de metaloproteinase 2 parecem estar relacionados a menor taxa de sobrevida global de pacientes portadores de câncer de vulva submetidas a tratamento cirúrgico. Pode ser realizada uma classificação para

o prognóstico de acordo com uma contagem de pontos atribuídos ao risco relativo destes fatores.

Descritores: 1. Neoplasias da vulva/patologia 2. Carcinoma de células escamosas/epidemiologia 3. Proteína supressora de tumor *p53* 4. Metaloproteinase 2 da matriz 5. Imunoistoquímica 6. Prognóstico

Summary

Zanvettor, Paulo Henrique. Study of biomolecular and clinical prognostic factors in patients with vulvar cancer undergoing surgical treatment. Zanvettor, Paulo Henrique. 2013. Thesis (Master) - Faculty of Medicine, University of São Paulo.

INTRODUCTION: Vulvar cancer accounts for 3-5% of all cancers of the female genital tract and approximately 0.6% of women's cancers. There are few studies on prognostic factors including molecular evaluation related to this disease. This study was conducted to evaluate clinical, epidemiological, pathological and molecular prognostic factors of patients with vulvar cancer, undergoing surgical treatment. A classification based on prognostic risk score related to the factors found was also evaluated. **METHODS:** Patients were selected with squamous cell carcinoma of the vulva who underwent surgical treatment at the Department of Pelvic Surgery and Department of Gynecology, Hospital Aristides Maltez between the period of June 1993 and June 2011. Clinical, epidemiological, and molecular and pathological anatomy characteristics were evaluated in relation to the prognosis of patients. Molecular assessment studied the expression of p53 protein and metalloproteinase 2 by immunohistochemical examination through the technical arrangement on matrix tissue samples (TMA). Based on the database performed on medical records held and the results of pathological anatomy and immunohistochemical tests, the statistical analysis was performed with respect to overall survival of patients. **RESULTS:** Seventy-five patients were eligible for the study. Univariate analysis shows how factors related to survival were the presence of lymph node metastasis suspected on clinical examination ($p = 0.004$), the larger size of 4 cm ($p = 0.001$), presence of lymph node metastasis ($p = 0.026$), staging groups ($p = 0.001$), the location median ($p = 0.011$), the depth of infiltration larger than 2 millimeters ($p = 0.012$), the expression of MMP 2 in more than 50% of the cells ($p = 0.009$). In multivariate analysis, factors related to survival were larger size than 4 cm ($p = 0.014$), depth of invasion greater than 2 mm ($p = 0.023$) and MMP2 expression in more than 50% of cells ($p = 0.046$). According to the relative risk of factors identified as related to prognosis by multivariate analysis, a score was developed for a prognostic classification. This score classifies into three categories, according to the presence or absence of the factors identified in the multivariate analysis and may correspond to three survival expectations. **CONCLUSIONS:** Prognostic factors as the size larger than 4 centimeters, depth of invasion greater than 2 mm and expression in more than 50% of tumor cells of metalloproteinase 2 may be related to lower overall survival rate of patients with cancer of the vulva undergoing surgery. Classification may be performed for the prognostic according to a count point attributed to the relative risk of these factors.

Descriptors: Descriptors: Vulvar neoplasms/pathology; Carcinoma, squamous cell/epidemiology; Tumor suppressor protein p53; Matrix metalloproteinase 2; Immunohistochemistry; Prognosis.

INTRODUÇÃO

---

1 - INTRODUÇÃO

Entre as neoplasias malignas próprias do sexo feminino, o câncer de vulva (Figura 1) representa menos de 4% dos cânceres do trato genital feminino e 0,6% entre todos os cânceres da mulher nos Estados Unidos da América. No mundo, são registrados 27.000 novos casos por ano.

Fonte: Serviço de Ginecologia do Hospital Aristides Maltez

Figura 1 – Aspecto do câncer de vulva invasor em região de períneo vulvar de uma paciente portadora de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011

No Brasil os dados estatísticos são escassos para esta doença, dados do Instituto Nacional do Câncer do Brasil - INCA (2003) através dos registros de base populacional mostraram 34 casos novos no ano de 2000 em Belo Horizonte; no período de 1997 a 2001, um total de 31 casos novos em Salvador

e 24 casos novos entre 1996 e 2000 no Distrito Federal. As estimativas de incidência de câncer no Brasil para 2012, do INCA, não apresentam dados para esta doença. Segundo a Fundação Oncocentro de São Paulo, com base em registros hospitalares de câncer, o número de casos novos em 2000 para o estado de São Paulo foi de 158, sendo 34,0% desses estádios I e II da doença. Para 2010 foram 129 casos novos mantendo a relação de 34,8% apenas de casos em estádios iniciais (I e II) FOSP (2011).

Nos Estados Unidos da América, o diagnóstico ocorre principalmente em mulheres entre 65 e 75 anos, apresentando-se em média aos 68 anos de idade. A incidência acontece principalmente na raça branca com 2,4 casos novos por 100.000 mulheres, estando o grupo das hispânicas, negras e asiáticas entre 0,9 e 1,8 casos novos por 100.000 mulheres (Howlander et al., 2011).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América do Norte publicou em 2009 um estudo realizado entre 1973 e 2004, para avaliação da incidência de câncer de vulva ao longo desses anos. Foi observado um aumento de 2,0 novos casos por 100.000 mulheres entre os anos de 1973 a 1980 para 2,5 novos casos por 100.000 mulheres entre 1997 a 2004 (Bodelon et al.2009).

Entre 1996 e 2003 a sobrevida global em cinco anos, independente do estágio, foi maior entre pacientes com menos de quarenta anos com 96%, do que no grupo com idade superior a 65 anos com 71,6%. A idade média de morte foi de 74 anos. Atualmente, estudos mostram a possibilidade do câncer de vulva se apresentar de duas formas clínicas: a primeira, que envolve lesões

associadas ao HPV, relacionamento sexual com múltiplos parceiros e de início precoce, além de a idade de incidência mais jovem. Também pode estar associado a relatos de lesões neoplásicas no colo uterino e região anal. O segundo grupo, sendo lesões sem associação à infecção por HPV, que ocorrem em pacientes idosas em torno dos 70 anos. São tumores bem diferenciados, carcinomas escamocelulares, podendo estar acompanhados de líquen escleroso ou hiperplasias de células escamosas. A mutação do gene supressor do tumor *P53* é frequentemente relatada. Os fatores de risco incluem o uso de cigarro, supressão do sistema imunológico, histórico de câncer de colo de útero relacionado ao HPV (Saraiya et al., 2008; Diego et al., 2004).

A maior parte dos cânceres de vulva está representada pelo carcinoma escamocelular (CEC) ou carcinoma epidermóide, em torno de 86,2% (Diego et al., 2004). O fator de risco para sobrevida mais importante descrito é a infiltração de linfonodos por câncer (Tabela 1).

O estudo dos parâmetros clínicos, anatomopatológicos e moleculares pode contribuir para estabelecer fatores de risco de recidiva do câncer e sobrevida.

Ainda para tentar esclarecer os mecanismos envolvidos nas etapas de formação de tumores epiteliais malignos, um grande número de moléculas tem sido descritas como envolvidas na progressão, invasão de tecidos, no processo de ocorrência de metástases ou como fator prognóstico de cânceres. Os carcinomas escamocelulares principalmente em tumores de cabeça e pescoço estão sendo estudados com relação à identificação de moléculas relacionadas à

presença de metástases em linfonodos ou como fatores prognósticos (Ondruschka et al., 2002; Katayama et al., 2004; Franz et al., 2005). São relativamente poucos os trabalhos sobre os aspectos moleculares em câncer do trato genital inferior – principalmente em vulva – que têm sido publicados, muitos deles com número de casos pequenos (Rosenthal et al., 2003; Lewy-Trenda et al., 2005, Pinto et al., 2010). Por vezes os estudos mostram resultados conflitantes, sem consenso sobre a associação de fatores clínicos ou moleculares com a sobrevida.

O fato do câncer de vulva ser doença relativamente rara na mulher torna difícil a determinação de fatores clínicos e moleculares com relação ao prognóstico.

1.1 Fatores clínicos e patológicos que influenciam no prognóstico do câncer de vulva.

1.1.1 Fatores Clínicos

Fatores como a idade e sintomas das pacientes não se mostram com consenso em relação a estarem relacionados à sobrevida do câncer de vulva (Paladini et al., 1994; Burger et al., 1995; Gadducci et al., 2012).

Os principais fatores que influenciam na mortalidade por câncer de vulva são o tamanho do tumor, a profundidade da invasão, a presença de metástases em linfonodos e metástases distantes, conforme foram

incorporados no sistema de estadiamento da FIGO-Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia. Quadro 1. (Pecorelli et al., 2009).

Quadro 1 – Estadiamento conforme critérios da FIGO-Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia 2009

Estádio	Descrição
Ia	Tumor <ou = 2cm confinado à vulva e com até 1mm de invasão, N0
Ib	- Tumor >2cm confinado à vulva e com até 1mm de invasão, N0
II	- Tumor de qualquer tamanho com extensão para uretra distal, vagina distal ou ânus
IIla	- Tumor de qualquer tamanho com ou sem extensão para uretra distal, vagina distal
IIlb	- Tumor de qualquer tamanho com ou sem extensão para uretra distal, vagina distal
IIlc	- Tumor de qualquer tamanho com ou sem extensão para uretra distal, vagina distal
IV	- Tumor de qualquer tamanho com extensão para uretra proximal, vagina proximal ou

Adaptado de: Pecorelli S et al., 2009

Um dos principais impactos na sobrevida ocorre quando há presença de metástase em linfonodos. Na literatura, como fator independente, a metástase nos linfonodos pode reduzir a sobrevida em 5 anos de 91% para 52%. Também

reduz a sobrevida livre de doença em 5 anos de 84% para 37%. Quanto ao risco de recidiva, pode aumentar cinco vezes na presença de acometimento em linfonodos unilateral. O impacto também é negativo na presença de apenas um linfonodo infiltrado (Woelber et al., 2009 e Woelber et al., 2012).

É de fundamental importância o estudo do processo de invasão do tumor nos tecidos e de invasão do sistema de linfonodos e seus impactos na sobrevida.

1.1.2 Tamanho do Tumor

O tamanho do tumor pode influenciar na ocorrência da metástase em linfonodos. Foi demonstrado por Donaldson (1981) o aumento de metástases linfonodais de 19% para 72% em lesões maiores de 3cm. Já em 1993, outro grupo de autores evidenciou o aumento de 31% para 54,3% caso os tumores fossem maiores a 2,0 cm (Homesley et al., 1993).

Sarian (2005) publicou um estudo de 59 mulheres com estágio I e II tratadas com cirurgia radical e linfonodectomia. O estudo demonstrou que acima de 2 centímetros no maior diâmetro, a invasão de linfonodos é significativamente mais frequente.

Na literatura, o relato é de que há aumento da infiltração de linfonodos quanto maior o estágio do tumor. Lesões de até 2 centímetros de diâmetro apresentam em torno de 20% de infiltração em linfonodos; acima de 2 centímetros a ocorrência de invasão em linfonodos aumenta para 44,8%;

tumores estágio II podem ter até 53% de infiltração (Iversen et al., 1981; Malfetano et al., 1986; Homesley et al., 1993).

1.1.3 Profundidade de invasão

A profundidade de invasão é definida pela medida da junção entre o epitélio e a derme da papila dérmica mais superficial, até a invasão mais profunda, medida de forma vertical. A invasão com profundidade menor ou igual a um milímetro é definido pelo estadiamento (FIGO, 2009) como T1 a estágio I (microinvasor) e tem risco mínimo de metástase de linfonodo. É tratada com retirada cirúrgica com um centímetro de margem de segurança tridimensional.

Em tumor de até 5 mm de invasão, o envolvimento de câncer em linfonodos pode alcançar até 18% (tabela 2). A frequência de invasão de linfonodos para tumores de até três milímetros oscila próximo de 4,8%. Torna-se nítido que quanto maior a invasão, maior a capacidade de metástases em linfonodos regionais.

Tabela 1 – Índices de sobrevida em cinco anos para câncer de vulva conforme infiltração do câncer em linfonodos

Casuística	Estado do linfonodo	N	Sobrevida%
Way et al.-1960	Positivo	45	42
	Negativo	36	77
Macafee et al.--1962	Positivo	33	33
	Negativo	49	70
Boyce et al.--1985	Positivo	30	50
	Negativo	49	82
Shimm et al.--1986	Positivo	33	52
	Negativo	65	77
Cavanagh et al.--1990	Positivo	77	39
	Negativo	126	85
Creasman et al.--1997	Positivo	444	49
	Negativo	983	90
Morley et al.--1976	Positivo	64	39
	Negativo	130	92
Krupp and Bahm-1979	Positivo	40	36
	Negativo	144	91
Franklin and Rutledge-1971	Positivo	33	39
	Negativo	53	100
Green et al.--1978	Positivo	46	33
	Negativo	61	87
Benedet et al.--1979	Positivo	34	53
	Negativo	86	81

Adaptado de: DiSaia; Creasman, 2007.

Tabela 2 – Carcinoma vulvar invasor: Frequência de metástase em linfonodos, com a profundidade de invasão do tumor de 5 milímetros ou menos

Autor	N	Número com linfadenectomia	% com metástase em linfonodo
Hoffman et al. 1985	75	46	13,3
Buscema et al. 1981	58	40	10,3
Sedlis et al. 1987	187	187	18,0
Iversen et al. 1981	70	70	7,1
Magrina et al. 1979	96	71	9,4
Fu et al. 1981	13	12	15,4
Rowley et al. 1988	22	22	9,0
Dvoretzky et al. 1984	36	NR	16,7
Wilkinson et al. 1982	30	27	6,7

Adaptado de: Di Saia; Creasman, 2007.

1.1.4 Metástases em linfonodos

A ocorrência de metástase em linfonodos regionais (regiões inguinais) é o fator patológico prognóstico mais importante para sobrevida global e sobrevida livre da doença. A sua presença pode ser unilateral ou bilateral, sendo o último mais associada a tumores de linha média. A sobrevida em cinco anos independente do estágio reduz de 90% para 40-50% na presença dessa forma de disseminação (Tabela 1). Pacientes com metástases em linfonodos apresentam risco de recorrência cinco vezes maior do que sem essa disseminação. No caso de metástase bilateral o risco de recorrência chega a ser 17 vezes maior. A redução de sobrevida também é demonstrada quanto maior o número de linfonodos infiltrados e ainda se ocorrerem metástases bilaterais. Quanto maior a infiltração dos linfonodos inguinais, maior a relação com doença dentro da cavidade pélvica e, com isto, a sobrevida reduz para 18-22% em cinco anos, independente do estadiamento do câncer de vulva. Dada a importância da infiltração em linfonodos, a sua avaliação precisa no estadiamento é de fundamental importância (Burger et al., 1995).

1.2 Fatores moleculares

1.2.1 O gene *TP53*

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 e codifica uma proteína nuclear de 53KDa, a proteína *p53*. É o gene mais

comumente envolvido na carcinogênese humana. A proteína *p53* tem efeito inibidor da proliferação e transformação celular, mantendo as células na fase G1 do ciclo celular. Atuam também no reparo do ADN, senescência celular e apoptose. As mutações do gene *TP53* estão distribuídas em todos os exons, embora haja predominância nos 4 e 9. A mutação gera proteínas *p53* mutantes que influenciam em várias etapas da carcinogênese. A proteína *p53* mutada antagoniza a proteína *p53* selvagem. As mutações do gene *TP53* ocorrem em estágios diferentes do processo de formação de cânceres, ocorrendo no início ou em um estágio mais avançado. A proteína mutada age também promovendo aumento das características de invasão e influenciar positivamente na angiogênese (Rolf et al., 2003; Rosenthal et al., 2003; Rivlin et al., 2011).

Figura 2 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo anti-p53. Exemplo de caso de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período de junho de 1993 a junho de 2011(aumento original de X 4)

A interpretação da demonstração imunohistoquímica da proteína *p53* tem base no fato de que a *p53* selvagem tem meia vida curta, sendo pouco detectável. As mutações a tornam estáveis aumentando a concentração e passando a ser detectável Figura 2. O câncer escamocelular de vulva HPV negativo possui maior presença de proteínas *p53* mutada, do que nos HPV positivos (Rosenthal et al., 2003). Emanuels (1999) conclui que a expressão aumentada da proteína *p53* é um evento tardio da doença não sendo preditivo de metástase em linfonodo.

1.2.3 Metaloproteinases

A família de metaloproteinase é definida pela presença do íon Zn^{2+} no centro catalítico. As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma parte das metaloproteinases que se constituem em 23 proteases em humanos (Roy et al., 2009). Sua atividade é inibida especificamente e de forma reversível por um grupo de inibidores endógenos conhecidos como Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMP). Foram identificados quatro tipos: TIMP-1, -2, -3, -4 (Branca et al., 2006). As metaloproteinases podem ser divididas em subclasses: collagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinas.

Na maioria dos órgãos, os principais componentes da matriz extracelular são colágenos, lamininas e proteoglicanos. As células tumorais expressam proteinases ou induzem a expressão dessas enzimas nas células do estroma para degradar a membrana basal e invadir o tecido. Várias metaloproteinases são associadas à degradação da matriz, crescimento tumoral e angiogênese.

Essa atividade proteolítica é requerida para a invasão de vasos sanguíneos adjacentes e disseminação em tecidos distantes para a implantação de um novo local de metástase.

A degradação da matriz extracelular produz elementos com propriedades biológicas únicas que podem desencadear vários sinais para células. A degradação do colágeno IV e laminina V podem gerar peptídeos que promovem a migração celular. As moléculas de e-caderina podem ser quebradas pelas MMP-3 e MMP-7 e realizar rotura de interações célula-célula quebrando a adesão celular e aumentando a possibilidade de migração (Kessenbrock et al., 2010).

As MMP têm sido identificadas como as responsáveis pela renovação da matriz extracelular com sua ação proteolítica e também podem ter participação no processo da angiogênese. No processo angiogênico ocorre o equilíbrio de fatores pró e anti-angiogênicos. A matriz extracelular é remodelada durante a angiogênese e é acompanhada pela atividade de metaloproteinases. Dentre as MMPs, as gelatinases 2 e 9, têm sido relacionadas na literatura a metástase tumoral e angiogênese. Um exemplo de avaliação imunohistoquímica das MMP 2 pode ser visto nas Figuras 3 e 4. Elas realizam a degradação da membrana basal abrindo caminho para a migração de células endoteliais para a formação de novos vasos. O processo de metástase envolve a liberação de células do tumor, sua migração para um vaso sanguíneo, penetração na corrente sanguínea ou sistema linfático, adesão ao endotélio e penetração no tecido que receberá a metástase. As gelatinases participam na migração das células do tumor e invasão no novo local de metástase. A MMP-9 tem papel ativo regulando

a biodisponibilidade ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é o mais potente indutor de angiogênese e grande alvo terapêutico. Por exemplo, no tumor de ilhota pancreática, a MMP-9 transmitida pela célula inflamatória permite mudança angiogênica promovendo maior ligação ao VEGF biodisponível por ser receptor VEGFR2. O aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9 têm sido relacionadas à capacidade de invasão, metástase e prognóstico de câncer do epitélio escamocelular como o de laringe, colo de útero e vulva (Katayama et al., 2004; Gorog et al., 2006; Maata et al., 2010).

Figura 3 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-MMP 2 negativo, com positividade em células inflamatórias. Exemplo de caso de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período de 1993 a 2001.(aumento original de X 200)

Figura 4 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-MMP 2 positivo. Exemplo de caso de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período de 1993 a 2011.(aumento original de X 100)

Tendo em vista os diversos aspectos que na literatura influenciam no comportamento e evolução do câncer de vulva é necessário o estudo dos fatores que influenciam no prognóstico desta doença.

OBJETIVOS

---

2 – OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa é analisar em pacientes portadoras de câncer de vulva atendidas e submetidas a tratamento cirúrgico no Hospital Aristides Maltez (HAM) entre o período de 1993 e 2011:

- Objetivo primário: Descrever e avaliar os fatores clínicos, anatomopatológicos e os marcadores moleculares *p53* e MMP-2 com a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (Tissue Microarray - TMA) associados à sobrevida.
- Objetivo secundário: Propor uma classificação de pontos para os fatores que tenham relação ao prognóstico do câncer de vulva na amostra.

MÉTODOS

---

3 – MÉTODOS

3.1 Casuística

O presente estudo foi realizado retrospectivamente com pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva tratadas no Departamento de Cirurgia Pélvica e Serviço de Ginecologia entre o período de Junho de 1993 e Junho de 2011. Através de pesquisa no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital Aristides Maltez (HAM) situado em Salvador (estado da Bahia) realizou-se uma seleção de 206 casos.

A partir de consulta de dados clínicos e de resultados de anatomia patológica nos prontuários das pacientes foi feito um banco de dados. Foi mantido o sigilo de identidade das pacientes e realizado consulta e aprovação do projeto pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais Aristides Maltez, Hospital do Câncer de São Paulo e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Anexo C.

3.1.1 Critérios de inclusão

A partir dos casos selecionados aplicamos os seguintes critérios de inclusão:

1-Pacientes devem ter prontuários acessíveis para consulta e contando com dados clínicos para preenchimento da ficha de avaliação.

2-Pacientes submetidos à conduta cirúrgica no decorrer do tratamento.

3-Pacientes devem possuir blocos de tecido tumoral arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez

4-Pacientes devem ter amostra de tecido sem tratamento prévio por radioterapia e quimioterapia.

Como resultado, foram identificados 75 casos que atendiam a todos os critérios.

3.1.2 Características clínicas

Foi realizada uma pesquisa de revisão de prontuário, aplicando um questionário padronizado de informações clínicas (Anexo A) em cada prontuário, possibilitando montar um banco de dados clínicos para a análise.

Os dados levantados na análise foram:

a) Idade da paciente

b) Sintoma referido pela paciente: prurido, sangramento, presença de tumor, sinais de infecção e dor.

c) Menopausa presente ou ausente.

- d)Aspecto macroscópico do tumor ao exame físico: ulcero-infiltrativo, vegetante, leucoplasia ou eritroplasia.
- e)Tamanho do maior diâmetro do tumor ao exame físico em centímetros.
- f)Local principal da lesão na vulva: clitóris, fúrcula, lábio maior ou lábio menor.
- g)Classificação do local do tumor: Mediano (definido como tumor distando até 1cm da linha média) ou lateral (definido como tumor que dista mais de 1cm da linha média).
- h)Avaliação da região inguinal no exame físico quanto à suspeita de metástase no linfonodo, se clinicamente positiva ou não.
- i)Os procedimentos cirúrgicos realizados nas pacientes: vulvectomy ampliada central, vulvectomy radical. Ou exenteração pélvica anterior.
- j)Cirurgia com linfonodenectomia ou não.
- k)Complicações pós-operatórias principais: infecção, sangramento, deiscência da sutura, trombose venosa profunda, óbito ate o trigésimo dia pós-operatório.
- l)Estadiamento do câncer de vulva conforme o sistema de estadiamento da FIGO 2009.
- m)Tratamento com radioterapia e quimioterapia realizado.

Em relação aos dados de anatomia patológica:

- a) Tamanho de tumor em milímetros-após conservação em formol
- b) Resultado da avaliação dos linfonodos retirados, se com infiltração tumoral ou não.
- c) Espessura total do tumor medida em milímetros na lâmina de HE
- d) Invasão tumoral no estroma, medida a partir da membrana basal e medida em milímetros.

Quanto ao seguimento, as pacientes foram classificadas em seis categorias:

- a) Viva sem câncer
- b) Viva com câncer
- c) Óbito pós-operatório,
- d) Óbito por câncer
- e) Óbito por outras causas
- f) Perda de seguimento.

3.2 Tratamentos realizados

Os procedimentos cirúrgicos realizados nas pacientes pela equipe cirúrgica do Serviço de Ginecologia do Hospital Aristides Maltez seguiram a sua padronização de condutas. Foram classificados como vulvectomy ampliada central definida como retirada cirúrgica com margens de segurança e livres tridimensionais e abrangendo toda a vulva e como vulvectomy radical quando incluía também a linfonodectomia inguinal com incisão transversa podendo ser unilateral ou bilateral. Houve um caso em que se optou por retirada cirúrgica ampla, de vulva, uretra e bexiga (exenteração pélvica anterior).

A radioterapia ao ser utilizada na região vulvar foi aplicada na dose de 45 a 50 Gray e indicada na necessidade de redução do tumor no pré-operatório ou na ocorrência de margem cirúrgica infiltrada pela doença. Na região inguinal na dose de 45 a 50 Gray quando sem linfonodectomia e 30 Gray quando após linfonodectomia com diagnóstico de infiltração tumoral em linfonodo retirado.

A quimioterapia utilizada em concomitância com a radioterapia foi com a droga cisplatina na dose de 25 miligramas por metro quadrado de superfície corpórea.

3.3 Anatomia patológica

3.3.1 Revisão de Lâmina

Foram separados os blocos de parafina e as lâminas dos tumores considerando a numeração que constava no laudo anatomopatológico arquivado no prontuário da paciente. Os casos foram analisados e revisados em lâminas com coloração de Hematoxilina Eosina - HE pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e pela Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo para confirmação de diagnóstico, avaliação dos parâmetros de anatomia patológica a serem estudados e em relação à qualidade de armazenamento para serem submetidos aos testes de imunohistoquímica.

No período do estudo foi utilizado formol tamponado a 10% (informação técnica do laboratório na época). Alguns casos tinham poucos blocos, enquanto outros tinham dezenas deles. Somente foram selecionados para a pesquisa de imunohistoquímica pacientes com biópsias feitas no HAM. Após seleção do bloco para análise pelo patologista foram confeccionadas novas lâminas, coradas pela técnica de HE, para revisão e para certificação da neoplasia e do diagnóstico de carcinoma de vulva para escolher a melhor região para confecção do arranjo em matriz de amostras teciduais – Tissue Microarray – TMA. Nas lâminas selecionadas, o local para a retirada do cilindro do bloco doador correspondente para a confecção do TMA foi marcado de caneta.

Nos casos submetidos a radioterápia ou quimioterapia pré-operatória, o bloco utilizado foi sempre aquele anterior ao tratamento, que geralmente correspondia ao da biópsia diagnóstica para não afetar o método de imunohistoquímica e a leitura das lâminas.

3.3.2 Avaliação de anatomia patológica para microscopia em hematoxilina e eosina:

Os blocos e lâminas das amostras dos casos foram revistos por dois médicos patologistas o Prof. Dr. Fernando Augusto Soares do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo e pela Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez. Os 75 casos selecionados foram submetidos à análise.

As informações pesquisadas no tumor primário foram:

a) Medida de tamanho do tumor primário

A medida de tamanho tumoral foi realizada através de régua de medida em milímetro. Constitui-se na medida em milímetros do tamanho do tumor medida no maior diâmetro.

b) Medida da invasão tumoral

A medida de invasão tumoral foi realizada através de régua de medida em milímetros para microscópio óptico. Constitui-se na medida em milímetros da

invasão neoplásica desde a membrana basal do epitélio até a área mais profunda de invasão do tumor no estroma, medida de forma vertical.

3.3.3 Construção do TMA:

A metodologia de construção do bloco de arranjo em matriz de amostras teciduais (Tissue Microarray -TMA) está detalhadamente descrita por Andrade *et al.* (2007). De posse dos casos, foram montados blocos utilizando-se o dispositivo técnico *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). A metodologia para construção dos blocos tem sido amplamente utilizada nos últimos anos, no Hospital do Câncer Antônio Cândido Camargo (Hospital A.C.Camargo)

As áreas do tumor foram selecionadas em lâminas de rotina e amostradas em novos blocos de parafina. Cilindros de 1,0mm da área tumoral obtidos pelo equipamento foram transferidos em duplicata para o novo bloco com posição bidimensional, separados por espaços de 0,2mm, determinados e gravados pelo equipamento. Deste novo bloco, chamado receptor, foram obtidos cortes histológicos realizados com micrótomo manual e transferidos em fita adesiva para as lâminas adesivas especiais (Instrumentics Inc., Hackensack, NJ, EUA). A fita adesiva foi retirada por exposição à luz ultravioleta, e as lâminas foram armazenadas e cobertas por parafina, embaladas a vácuo e congeladas em freezer a -20°C.

Fonte: Kononen et al. (1998)

Figura 5 – Técnica de Confecção de arranjos de matriz de amostras teciduais TMA. Modificado de : Konen et al. (1998).

Figura 6 – Microfotografia. Exemplos de TMA. Exemplo de carcinoma escamocelular estudados com a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo.

3.3.4 Anticorpos Primários:

As reações de imunohistoquímica em cortes parafinados foram realizadas pela técnica de polímero sem biotina, utilizando-se os seguintes anticorpos: anti-MMP-2 e anti-p53.

Tabela 3 – Especificação técnica dos anticorpos utilizados para a avaliação imunohistoquímica da amostra do estudo dos casos de câncer de vulva do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 a junho de 2011

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição
MMP-2	Neomarkers	Policlonal	1:100
p53	DO7	DAKO	1:100

A recuperação antigênica utilizada foi de forma automatizada no equipamento Benchmark XT, Ventana, Tucson, AZ, USA.

A amplificação no aparelho Ventana Polymer.

3.3.5 Ensaios imunohistoquímicos nos TMAs:

Lâminas de TMA foram submetidas à incubação a 60°C por 1 hora a fim de retirar a camada protetora de parafina. A desparafinização foi realizada, seguida por recuperação antigênica realizada através de calor úmido em panela de pressão a 98°C por 15 minutos em tampão citrato (pH 6.0). A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada em três banhos, por 5 minutos cada, em água oxigenada 30 volumes. Posteriormente foram adicionados 100µL de Dako

Protein Block Serum-Free em cada lâmina durante 20 minutos. A imunorreação ocorreu à temperatura ambiente com a incubação com os anticorpos primários específicos durante duas horas em câmara úmida.

Após sucessivas lavagens em tampão PBS, foram incubados 100µL de DAKO Advanced Link por 30 minutos. Novas lavagens foram feitas com tampão PBS e adicionou-se 100µL de DAKO Advanced Enzyme por trinta minutos. Após novas lavagens, as lâminas foram coradas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 3 a 5 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas com Permount (Fisher Scientific). As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e um controle negativo, obtido pelo não uso do anticorpo primário durante a reação.

3.4 Avaliação das Imunoexpressões

Após avaliar em microscopia de pouco aumento para a escolha da área melhor corada em pelo menos dez campos, foram avaliadas em grande aumento. A presença de precipitação marrom escura claramente visível foi considerada como imunorreação presente. A avaliação incluiu a proporção de células reativas no tumor e a sua intensidade de coloração.

A proporção descrita foi a fração de células tumorais usando um sistema de gradação utilizado no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer Antônio Cândido Camargo (Hospital A.C.Camargo) Soares 2006:

- a) 0 ou negativo: se <5% de células coradas
- b) Fraco positivo: 5-50% de células coradas
- c) Forte positivo: 51% ou mais de células coradas

Quanto ao *p53*:

- a) Negativo: se <10% de células coradas
- b) Positivo: se >10% de células coradas

3.5 Análise estatística descritiva e de associação de fatores prognósticos relacionados à sobrevida

Os dados coletados foram analisados utilizando programa estatístico SPSS 20.0 for Windows

1. Análise descritiva da distribuição de casos para cada dado.
2. Análise da associação entre as variáveis qualitativas através de teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, considerando testes bicaudados e valores de “p” significativos menores ou iguais a 0,05.
3. A análise comparativa de sobrevida global por câncer através de curvas construídas pela técnica de Kaplan-Meier e teste não paramétrico univariado do log-rank de acordo com as diferentes variáveis. O tempo de seguimento utilizado para o cálculo de sobrevida global foi calculado a partir da data da primeira avaliação clínica no Serviço de Ginecologia do Hospital Aristides Maltez e a data da ocorrência do último seguimento

ou o óbito das pacientes. Os critérios de censura para a curva de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier ou para utilização da regressão de Cox foram: pacientes que não compareceram ao hospital em um período maior que duas vezes o período estipulado pelo médico para seus retornos (ou não responderam a solicitações de contato enviadas pelo Hospital Aristides Maltez) foram considerados como perdidos de seguimento na data da ultima informação. Esses pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até esta data, sendo classificados sob censura. O tempo de seguimento foi truncado para 60 meses.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 Características clínicas e descritivas das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

A amostra total dos casos se constitui de 209 pacientes, que após aplicação dos critérios de inclusão representaram amostra final de 75 casos. A distribuição dos pacientes conforme aspectos clínicos estão contidos na Tabela 4. A idade variou entre 35 e 96 anos, com média de 67,4 anos.

Tabela 4 – Características clínicas e resultados da amostra das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Característica	% de casos
Idade média (anos)	67,4 anos
Sintoma	
Prurido	38,7%
Sangramento	17,3%
Tumor/massa	66,7%
Infecção	18,7%
Menopausa presente	80,0%

Os principais aspectos encontrados ao exame físico das pacientes estão relacionados na Tabela 5.

Tabela 5 – Características encontradas no exame físico das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Aspecto macroscópico da lesão	% de casos
Ulcerado-infiltrativo	46,7%
Vegetante	44,0%
Eritroplasia	2,7%
Leucoplasia	5,3%
Tamanho médio do tumor	3,86cm
Topografia na vulva	
Clitóris	28,0%
Períneo	16,0%
Lábio maior	42,7%
Lábio menor	13,3%
Local do tumor	
Medial	58,6%
Lateral	41,3%
Suspeita de infiltração cancerosa do linfonodo no exame clínico	29,3%

A distribuição dos tratamentos realizados está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Tratamentos realizados nas pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Tratamentos realizados	% de casos
Vulvectomy ampliada central	28,0%
Vulvectomy radical	38,7%
Vulvectomy ampliada central + radioterapia	17,3%
Vulvectomy radical + radioterapia	9,3%
Vulvectomy ampliada central + radioterapia + quimioterapia	5,3%
Exenteração pélvica	1,3%

Dos pacientes submetidos à linfonodectomia foram encontrados 12 casos (16% do total de casos) com infiltração tumoral.

O estadiamento do câncer de vulva pelo critério da FIGO 2009 considerando todos os casos mostrou estágio Ia com 9,3%; estágio Ib com 42,7%; estágio II com 16%; estágio IIIa com 12%; estágio IIIb com 18,7%; e estágio IIIc com 1,3%. Por grupo de estadiamento do tumor o mais frequente foi o estágio I com 52% e a distribuição se encontra na Tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição dos casos por grupos de estadios de acordo com o Estadiamento FIGO 2009 das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Distribuição por grupos de estadiamento	% de casos
I	52,0%
II	16,0%
III	32,0%

4.2 Características de anatomia patológica descritivas da amostra

As pacientes apresentavam tamanho tumoral médio de 3,86 cm. Foram encontrados 12 casos com infiltração em linfonodos retirados. Em relação à medida de invasão tumoral no estroma a média foi de 4,40mm.

4.3 Resultados da expressão dos marcadores moleculares da amostra

As expressões dos marcadores nos cânceres de vulva estudados apresentaram para *p53* 65,3% de casos positivos e 34,7% negativos. Em relação às expressões de MMP-2 apresentaram negatividade em 32% e 54,7% de fraco positivo e 13,3% de forte positivo. Esses resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados dos testes de avaliação das expressões imunohistoquímicas das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

	Expressão do <i>p53</i> (%)
Menor de 10%	34,7
Maior de 10%	65,3
	Expressão do MMP2 (%)
Menor de 5%	32,0
Entre 5 e 50%	54,7
Maior de 50%	13,3

4.4 Análise univariada comparativa de sobrevida global por câncer de acordo com as variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

4.4.1 Tempo de seguimento e sobrevida global da amostra

O tempo de seguimento da amostra foi até 60 meses. No último seguimento os estados das pacientes foram 45 (60%) vivas sem doença, 22 (29,3%) óbitos por doença, 3 (4%) óbitos por outras causas, 4 (5,3%) vivas com doença, 1 (1,3%) óbito pós-operatório.

A sobrevida global da amostra em 60 meses foi de 68,0%.

Gráfico 1 – Sobrevida global das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011, conforme a idade, baseado na idade mediana (n=75)

Sobrevida %

4.4.2 Análise das variáveis clínicas

Dentre as variáveis clínicas a idade, os sintomas (prurido, sangramento, presença de sangramento, presença de tumor, sinais de infecção, dor), presença ou não de menopausa, aspecto clínico da lesão (ulcerada e infiltrativa, vegetante, leucoplásica ou eritroplásica), localização do tumor na vulva, tratamentos realizados (tipo de cirurgia, radioterapia, quimioterapia), realização de linfadenectomia, não foram relacionadas a diferentes taxas de sobrevida na análise univariada Tabelas 9,10,11 e 12.

Tabela 9 – Características clínicas das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)
-análise univariada

Variável	Sobrevida 5 anos (%)	Valor p
<i>Idade</i>		
<70anos	61,9	0,472
>70 anos	68,8	
<i>Sintoma</i>		
Prurido sim	74,8	0,183
Prurido não	58,8	
Sangramento sim	58,7	0,612
Sangramento não	66,8	
Tumor sim	64,0	0,759
Tumor não	67,8	
Infecção sim	62,9	0,973
Infecção não	66,1	
Dor sim	71,1	0,556
Dor não	61,4	
Menopausa sim	60,4	0,080
Menopausa não	84,6	

As variáveis tamanho do tumor, classificação de tumor como mediano ou lateral, presença de linfonodo clinicamente fortemente suspeito de infiltração cancerosa, presença de linfonodo positivo na linfonodectomia e estadiamento FIGO por grupos, se mostraram como fatores prognósticos em análise univariada com diferentes taxas de sobrevida em 5 anos. Tabelas 09 e 10, Gráfico 1.

Tabela 10 – Características do tumor ao exame físico das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75) -análise univariada

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Valor de p
Localização		0,011
Mediano	53,4	
Lateral	82,2	
Aspecto da lesão		0,143
Ulcerado-infiltrativo	55,1	
Vegetante	70,5	
Leucoplásico	100	
Eritroplásico	100	
Topografia da vulva		0,157
Clitóris	45,7	
Períneo	71,3	
Lábio menor	78,8	
Lábio maior	72,6	
Linfonodo suspeito	42,5	0,004
Linfonodo não suspeito	80,1	

Em relação à classificação de tumor como mediano ou lateral, os medianos tiveram sobrevida por câncer em 5 anos de 56,8% e os laterais de 83,9% ($p=0,011$), Gráfico 2.

Gráfico 2 – Curva de sobrevida conforme classificação do tumor em mediano ou lateral das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

A presença de linfonodo clinicamente suspeito de metástase apresentou sobrevida de 45,5% em 5 anos e 77,4% quando não suspeito ($p=0,004$), Gráfico 3.

Gráfico 3 – Curva de sobrevida conforme presença de forte suspeita de metástase em linfonodos ao exame físico das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

O grupo de pacientes sem metástase em linfonodo retirado na linfonodectomia apresentou sobrevida em 5 anos de 81,5% e para as pacientes com metástase nos linfonodos, a sobrevida foi de 50,0% e de 63,9%, quando não realizada a linfonodectomia ($p=0,026$), Gráfico 4.

Gráfico 4 – Curva de sobrevida conforme estado do linfonodo retirado na linfonodectomia quanto à metástase presente ou ausente e comparado à linfonodectomia não realizada das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

O estadiamento por grupos conforme critérios da FIGO apresentou para o estágio I sobrevida de 82,1% em 5 anos, para o estágio II sobrevida de 75,0% e para o estágio III sobrevida de 41,7%(p=0,001). Tabela 11, Gráfico 5.

Tabela 11 – Estadiamento por grupos conforme o sistema de estadiamento FIGO 2009 das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

-análise univariada

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Valor de p
Estádio por grupos		0,001
Estádio I	80,4	
Estádio II	72,7	
Estádio III	37,1	

Gráfico 5 – Curva de sobrevida por grupos I, II e III conforme o estadiamento com critérios da FIGO 2009 das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

O estadiamento por grupos conforme critérios da FIGO e classificados em duas categorias – uma com estádios I e II apresentou sobrevida em 5 anos de 80,4% e no estágio III sobrevida de 41,7% em 5 anos($p<0,000$), Gráfico 6.

Gráfico 6 – Curva de sobrevida conforme critérios da FIGO 2009 e classificados em duas categorias, uma com estádios I e II e a outra com o estágio III das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

4.4.3-Análise das variáveis anatomopatológicas

O tamanho do tumor de até 4 cm apresentou sobrevida de 84,2% em 5 anos e 50,0% se tamanho maior de 4 cm ($p=0,001$). Tabela 12, Gráfico 7.

As taxas de sobrevida em 5 anos são diferentes entre os grupos de acordo com a profundidade da invasão do tumor, caracterizando fator de prognóstico.

O grupo de pacientes com profundidade de invasão de até 1mm apresentou sobrevida de 85,7% em 5 anos; para a profundidade entre 1,1mm e 2,0 mm a sobrevida foi de 100% e para a profundidade maior de 2,0mm a sobrevida de 58,2 ($p=0,012$). Tabela 12, Gráfico 8.

Tabela 12 – Avaliações de anatomia patológica de amostras de tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

-análise univariada

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Valor de p
Avaliações de anatomia patológica		
Tamanho do tumor		0,001
Menor de 4 centímetros	84,2	
Maior de 4 centímetros	50,0	
Profundidade de infiltração		0,012
Até 1 milímetro	85,7	
Entre 1,1 e 2,0 milímetros	100	
Maior de 2,0 milímetros	58,2	

Gráfico 7 – Curva de sobrevida conforme tamanho do tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

Gráfico 8 – Curva de sobrevida conforme a profundidade de invasão do tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

Tempo em meses

Quando agrupados em profundidade de invasão de até 2,0 mm a sobrevida foi de 95,0% e para a profundidade maior de 2,0mm a sobrevida foi de 58,2($p=0,004$), Gráfico 9.

Gráfico 9 – Curva de sobrevida conforme profundidade de invasão do tumor e agrupados em profundidade de invasão de até 2mm e maior de 2 mm das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

4.4.4 Análise das variáveis moleculares

Dentre os marcadores testados nos tumores primários o *p53* não foi relacionado a diferente taxa de sobrevida. O grupo de pacientes com expressão de *p53* menor de 10% apresentou sobrevida em 5 anos de 70,1% e de 62,8% para a expressão superior a 10% ($p=0,456$). Tabela 13.

Em relação a MMP-2, essa foi relacionada a diferentes taxas de sobrevida.

O grupo de pacientes com expressão de MMP-2 em menos de 50% apresentou sobrevida em 5 anos de 72,3% e para a expressão superior a 50% a sobrevida foi de 40,0% ($p=0,003$). Tabela 13, Gráfico 10.

Tabela 13 – Expressões das moléculas *p53* e MMP2 de amostras de tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

-análise univariada

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Valor de p
Expressão do <i>p53</i>		0,456
Menor de 10%	70,1	
Maior de 10%	62,8	
Expressão do MMP2		0,009
Menor de 5%	79,2	
Entre 5 e 50%	68,3	
Maior de 50%	40,0	
Expressão do MMP2		0,003
Menor de 50%	72,3	
Maior de 50%	40,0	

Gráfico 10 – Curva de sobrevida conforme expressão de MMP-2 nas amostras de tumor e agrupados em duas categorias, com expressão de até 50% e acima de 50% das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

O grupo de pacientes com expressão de MMP-2 menor de 5% apresentou sobrevida em 5 anos de 79,2%; para a expressão entre 5 e 50% a sobrevida foi de 68,3% e para expressão acima de 50% foi de 40,0% ($p=0,009$), Gráfico 10.

Gráfico 11 – Curva de sobrevida conforme expressão de MMP-2 nas amostras de tumor das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

Sobrevida %

4.5 Análise multivariada comparativa de sobrevida global por câncer de acordo com as variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

A análise multivariada (modelo de Cox) mostrou que os fatores relacionados ao prognóstico das pacientes com câncer de vulva identificados foram o tamanho do tumor superior a 4 centímetros no maior diâmetro ($p=0,014$), a profundidade de invasão no estroma maior de 2 milímetros ($p=0,023$) e a expressão da metaloprotease 2 superior a 50 por cento das células tumorais ($p=0,046$). Tabela 14.

Tabela 14 – Variáveis independentes relacionadas com o óbito das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

na análise multivariada (modelo de Cox)

Variável	Categoria	N	HR (*)	IC95%	valor de p
Tamanho	Até 4 cm	38	1,0	Referência	0,014
	< 4 cm	36	3,4	1,3 – 9,0	
Profundidade	Até 2 mm	20	1,0	Referência	0,023
	> 2 mm	54	10,9	1,4 – 85,6	
MMP2	Até 50%	64	1,0	Referência	0,046
	> 50%	10	2,7	1,02 – 7,1	

(*) Variáveis ajustadas pela idade (variável contínua), risco relativo: (HR)

Conforme a análise multivariada, ao atribuir pontos para o risco relativo dos três fatores identificados, pode-se elaborar uma contagem de prognóstico. Os três fatores seriam pontuados da seguinte forma: o tamanho do tumor maior

de 4 cm com valor de 3 pontos, a profundidade de invasão maior de 2 milímetros com valor de 11 pontos e a expressão de MMP2 presente em mais de 50% com valor de 3 pontos. A contagem teria variação de 0 a 17 pontos conforme a soma dos valores de risco relativo encontrados.

Assim ao classificar-se a taxa de sobrevida variando de acordo com a soma de pontos, onde 0 pontos (nenhum fator presente) corresponde à sobrevida em 5 anos de 100%; entre 3 e 14 pontos (dois fatores presentes) corresponde à sobrevida em 5 anos de 85,3%; e com mais do que 14 pontos (todos fatores simultâneos), correspondente à sobrevida em 5 anos de 31,4% (Log-rank: $p < 0,001$), obtém-se uma classificação de risco, Gráfico 11.

Gráfico 12 – Curva de sobrevida conforme a contagem de pontos dos fatores independentes relacionados ao óbito das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 pela análise multivariada (n=75)

Azul = contagem 0: nenhum ponto
 Verde = contagem 1: 3 a 11 pontos
 Bege = contagem 2: mais do que 11 pontos (3 fatores simultâneos)

DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

O câncer de vulva é tumor relativamente raro e apresenta poucos estudos sobre fatores prognósticos em carcinomas escamocelulares. A avaliação desses fatores pode melhorar os critérios para a seleção de terapêuticas dos pacientes.

5.1 Fatores prognósticos clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e biomoleculares das pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

– análise univariada

5.1.1 Fatores clínicos e epidemiológicos

O presente estudo retrospectivo foi realizado com pacientes portadoras de carcinoma escamocelular de vulva admitidas e tratadas no Departamento de Cirurgia Pélvica e Serviço de Ginecologia do Hospital Aristides Maltez entre o período de Junho de 1993 e Junho de 2011.

Conforme os achados, a idade média das pacientes foi de 67,4 anos e a menopausa ocorreu em 80% dos casos desse estudo, concordante com autores como Rutledge et al. (1991), Nola et al. (2005) e Ayhan et al.(2008), porém sem

apresentar relação estatística com prognóstico. Na América Latina, em Cuba, o estudo de Diego et al. (2008) mostra uma idade média próxima à dessa série, com 63,4 anos assim como Baiocchi et al. (2013) com 67 anos, no Brasil. A literatura mostra relação entre idade e prognóstico, sendo que autores como Raspagliese et al. (2006), Nola et al. (2005) e Blecharz et al (2008) encontraram faixa etária relacionada ao pior prognóstico. Um grande estudo de Stroup et al. (2008) com base no banco de dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América mostra risco de morte maior em pacientes com câncer de vulva em estádios avançados em pacientes acima de 75 anos quando em comparação com pacientes entre 20 e 49 anos nos mesmos estádios.

O principal sintoma foi o surgimento de tumor vulvar presente em 66,7% seguido de prurido com 38,7% dos casos e é concordante com Diego et al. (2008) que encontrou 50,1% e 41, 0% respectivamente. Também Piura et al.(1998) e et al. (2005) encontraram o tumor como sintoma mais frequente, seguido de prurido. Não se observou relação estatística com prognóstico.

O aspecto morfológico do tumor na vulva com ulceração e infiltração foi o mais frequentemente encontrado em 46,7% dos casos, sendo o vegetante em segundo lugar, porém sem apresentar significância estatística com o prognóstico. Segundo Li-Qun Xu et al. (2013), os tumores nodulares ou infiltrativos frequentemente crescem penetrando o tecido, invadem mais precocemente os vasos angiolinfáticos e dão menos sintomas; os vegetantes crescem externamente, invadem os vasos linfáticos de forma mais tardia e em sua série de casos observou melhor prognóstico. Ayhan et al. (2008) relacionou

a presença de tumor ulcerado com o maior risco de recorrência da doença e Raspagliese et al. (2006) correlacionou com pior prognóstico.

A topografia vulvar mais frequente para a ocorrência dos cânceres de vulva é o lábio maior. Hampl et al.(2008), apesar de confirmar esse achado no período até 1998, relata uma mudança nessa ocorrência mais frequente entre clitóris e uretra no período entre 1998 a 2007. A avaliação do local do tumor entre medial e lateral no presente estudo mostrou maior frequência de tumores mediais e se relacionou a uma menor sobrevida com a localização medial. Na literatura não há concordância: Raspagliesi et al. (2006), não observou diferença de prognóstico e, conforme o autor Li-Qun XU et al.(2013), o prognóstico pode ser melhor nos medianos; Stankevika et al. (2012) apresenta melhor prognóstico na topografia mediana em sua casuística, embora seja atribuído ao tratamento mais agressivo nesses casos.

Em relação à posição do tumor dentre os quatro locais da vulva (clitóris, períneo, lábio maior e lábio menor) não se comprovou relação ao prognóstico nessa série de casos.

A presença de linfonodo suspeito de metástase na região inguinal ao exame clínico demonstrou relação ao prognóstico nesse estudo. Esse fato deve ter ocorrido pela região inguinal se apresentar com características clínicas muito compatíveis com metástases instaladas, uma vez que, conforme a literatura, Iversen T (1981) mostrou discrepância entre a avaliação clínica e anatomopatológica de linfonodos inguinais em casos de câncer de vulva. Em pacientes com suspeita de metástase em linfonodos ao exame clínico, a

ausência de metástases era de 15% (porém 36% dos pacientes com metástases inguinais não apresentaram suspeita no exame físico). Sarian et al.(2005) encontrou 20% de falso positivo na palpação inguinal sem suspeita clínica. Bosquet et al. (2003) relatou 19,5% de falso negativo e 21,8% de falso positivo na avaliação da palpação dos linfonodos inguinais. Porém, autores como Homesley et al. (1993) e LI-Qun Xu et al.(2013) referem que critérios de palpação inguinal podem ser importantes fatores preditores de metástases inguinais.

Foi encontrada relação estatística de prognóstico segundo o estadiamento FIGO 2009. Na classificação dos casos houve maior frequência das pacientes com tumores sem disseminação para linfonodos (estádios I e II que somados ocorreram em 68% dos casos) e 32% de pacientes em estágio III, sendo que o estadiamento mais avançado apresentou relação estatística ao pior prognóstico.

O estadiamento do câncer de vulva mudou de clínico para cirúrgico conforme a FIGO em 1988 (Hopkins MP et al. 1992) e um dos fatos que contribuiu foi a pouca correlação entre a palpação inguinal e o achado de metástases inguinais após a cirurgia de linfonodectomia inguinal e a necessidade de haver correlação com dados cirúrgicos e de anatomia patológica. Na revisão de 2009 da classificação da FIGO os tumores antes classificados como Ib e II foram agrupados no estágio II por apresentarem prognósticos semelhantes, agrupando tumores de diferentes tamanhos. No atual estágio II, os principais critérios são o de ser invasor de mais de 1 milímetro e não apresentar metástases, sendo que o índice de sobrevida é semelhante aos antigos Ib e II. O principal fator de diferença no prognóstico das pacientes no

estádio I é a profundidade de invasão medida em milímetros e para o estágio III a presença de metástase em linfonodos, conforme Homesley et al. (1991) e Hacker et al. (2009). Por outro lado, a literatura mostra que o tamanho em análise univariada também pode ser fator prognóstico como citado adiante.

Em relação aos grupos de tratamento realizado não houve diferença estatística quanto ao prognóstico. A realização da linfonodectomia no tratamento cirúrgico não se mostrou relacionada ao prognóstico na população estudada. A literatura relata a importância da linfonodectomia através de et al. (2003), e a necessidade de haver um número mínimo para garantir a eficácia do procedimento em controlar a doença localmente conforme Butler et al. (2010) e Baiocchi et al. (2013).

O tratamento complementar em pacientes com lesão metastática em linfonodo com radioterapia tem sido associado a aumento de sobrevida conforme Tombolini et al. (2005), Parthasarathy et al. (2006) e Woelber et al. (2012). A associação de quimioterapia sensibilizante durante a radioterapia foi utilizado a partir do ano de 2006 e se manteve no protocolo do Serviço de Radioterapia do Hospital Aristides Maltez. A literatura, porém, não mostra consenso sobre a associação devido aos pacientes serem em sua maioria idosos e com outras doenças sistêmicas concomitantes. Muitas das doenças associadas na faixa etária de maior frequência causam doenças microvasculares, podendo aumentar as complicações urológicas, proctológicas, vaginais ou de necrose óssea, pela potencialização dos efeitos da radioterapia. Portanto, o efeito de melhora do índice de sobrevida da radioterapia concomitante com quimioterapia deve ser melhor estudado e não

considerado como fator prognóstico independente, conforme Moore et al. (2009), Shylasree et al. (2011) e Stuckey et al. (2013).

5.1.2 Fatores de anatomia patológica

Os dados de anatomia patológica foram medidos nas peças de anatomia patológica que foram fixadas em solução de formol.

A medida média do tamanho do tumor no presente estudo foi 3,86 cm, compatível com Baiocchi et al. (2013) que observou 5 cm. O tamanho maior de 4 cm apresentou relação com o prognóstico. Na literatura são encontrados vários relatos concordantes com o achado de que o tamanho tumoral afeta o prognóstico, com alguma variável de tamanho estudado entre os autores, como Piura et al. (1998), Chan et al. (2007) Bozanovic et al. (2007), Woelber et al. (2009), Iacopone et al. (2013) e Afandy et al. 2013. Outros, como Homesley et al. (1993), Raspagliese et al. (2006) e Sun et al. (2012), não correlacionam o tamanho ao prognóstico. Como discutido no item anterior sobre dados clínicos na revisão do estadiamento da FIGO de 2009, os tumores iniciais (Ia e Ib da FIGO) foram agrupados no estágio II por terem prognósticos semelhantes mesmo que com diferentes tamanhos.

A profundidade de infiltração média do tumor foi de 4,4 mm. A infiltração do estroma é critério prognóstico conforme o estadiamento da FIGO e divide o estágio I em Ia se menos de 1mm e Ib se maior de um milímetro. Os autores Chan et al. (2007), Woelber et al. (2009) e Iacoponi et al. (2013) observaram que profundidades de invasão média superior a 4mm são relacionadas a pior

prognósticos e Nicoletto et al. (2010) encontrou pior evolução em tumores que invadem mais de 9mm do estroma.

Os pacientes com metástases em linfonodos são considerados como portadores de pior prognóstico por vários autores na literatura, dentre eles Podratz et al. (1982), Rutledge et al. (1991), Homesley et al. (1991), Paladini et al. (1994), Raspagliesi et al. (2006), et al. (2008), Woelber et al. (2009), e Gadducci et al. 2012. Inclusive quanto ao número de linfonodos com metástases estar relacionado ao pior prognóstico, conforme Van der Stan et al. (2010), Sun et al. (2012) e Baiocchi et al. (2013). No presente estudo a metástase em linfonodo inguinal se mostrou correlacionar com pior prognóstico na análise univariada.

5.1.3 Fatores moleculares

A expressão positiva do marcador da proteína *p53* por avaliação imunohistoquímica nos cânceres de vulva estudados apresentaram 65,3% de casos positivos e 34,7% negativos. Na análise univariada não apresentou relação estatística com o prognóstico das pacientes. Não há consenso sobre a relação da expressão da proteína *p53* com o prognóstico dessas pacientes.

Kohlberger et al. (1995) encontrou 50% das pacientes portadoras de câncer de vulva com aumento da expressão da proteína *p53* e encontrou correlação estatística com o prognóstico. Salmaso et al. (2000) demonstrou não somente o aumento da expressão com fator de pior prognóstico, como

diferenciou em dois grupos distintos de acordo com o padrão de distribuição da expressão. O padrão difuso de distribuição no tecido tumoral como sendo de pior prognóstico em relação ao padrão de distribuição focal.

Scheistroen et al. (1999) encontrou 55% dos cânceres de vulva estudados apresentando aumento da expressão da proteína *p53*, sugerindo que a mutação estivesse envolvida no processo neoplásico. Em sua série de casos identificou correlação com o prognóstico apenas no estágio III, onde a expressão aumentada significou pior prognóstico.

McConnell DT et al (1997) não encontrou relação da expressão da proteína *p53* com o prognóstico e ainda encontrou expressão da proteína *p53* em alterações não neoplásicas do epitélio adjacente. Kagie et al. (1997), também não conseguiu correlação do aumento da expressão da proteína com o prognóstico.

O aumento dessa expressão tem sido relacionada a evento tardio no câncer de vulva, conforme Emanuels et al. (1999), e relacionado aos cânceres de vulva em idosas sem o vírus HPV, segundo Engelman et al. (2003).

Em relação às expressões de MMP-2 na série de casos deste estudo, encontrou-se negatividade em 32%, em 54,7% fraco positivo, e 13,3% de forte positivo. O grupo de pacientes com expressão de MMP-2 em menos de 50% apresentou sobrevida em 5 anos de 72,3% e para a expressão superior a 50% a sobrevida foi de 40,0% com relação estatística presente ($p=0,003$). Também o grupo de pacientes com expressão de MMP-2 menor de 5% apresentou

sobrevida em 5 anos de 79,2%; para a expressão entre 5 e 50% a sobrevida foi de 68,3%; e para expressão acima de 50% foi de 40,0% ($p=0,009$).

Na literatura existem poucos estudos sobre a expressão da metaloprotease 2 e câncer de vulva. As metaloproteases são enzimas proteolíticas consideradas críticas para a invasão das células tumorais e metástases. As células tumorais elaborariam enzimas para degradar a membrana basal e matriz de colágeno e utilizando esta proteólise migrariam através da matriz. Essa hipótese foi suportada por substratos de matriz degradada por metaloproteases encontradas junto com a expressão aumentada dessas enzimas em células tumorais *in vitro* e *in vivo* conforme Rosenthal et al. (1998) e Sabeh et al. (2004). Em carcinomas escamocelulares de tumores de cabeça e pescoço, autores como Shimada et al. (2000) e Rosenthal et al. (2006) observaram o efeito de degradação de metaloprotease 2 na matriz extracelular. Também o aumento da expressão da MMP-2 foi relacionado ao prognóstico de carcinomas escamocelulares de língua por Yoshizaki T et al. (2001). Em carcinomas escamocelulares de pênis, Campos et al. (2006) não encontrou relação da MMP-2 com prognóstico ou recorrência, e Soares et al. (2006) demonstrou aumento da expressão de MMP-2 em tumores pouco diferenciados e invasivos. Määttä et al. (2010) relacionou o aumento da expressão da MMP-2 com a progressão de neoplasia intraepitelial de vulva para carcinoma escamocelular invasor. Bovo et al. (2004) observou o aumento da expressão de MMP-2 em carcinomas escamocelulares de vulva em relação ao epitélio normal, neoplasias intraepiteliais e ao líquen escleroso da vulva.

5.2 Fatores prognósticos clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e biomoleculares das pacientes portadoras de câncer de vulva da amostra estudada do Hospital Aristides Maltez no período entre junho de 1993 e junho de 2011 (n=75)

– análise multivariada

Na análise multivariada (modelo de Cox) os fatores relacionados ao prognóstico (óbito) das pacientes com câncer de vulva identificados foram o tamanho do tumor superior a 4 centímetros no maior diâmetro ($p=0,014$), a profundidade de invasão no estroma maior de 2 milímetros ($p=0,023$) e a expressão da metaloprotease 2, superior a 50 por cento das células tumorais ($p=0,046$).

Em vista dos achados desta análise podemos realizar uma escala de risco. Ao atribuir-se pontos para o risco relativo, obtém-se o tamanho do tumor maior de 4 cm com valor de 3 pontos, a profundidade de invasão maior de 2 milímetros com valor de 11 pontos e a expressão de MMP2 presente em mais de 50% com valor de 3 pontos.

Pode-se realizar uma contagem de pontuação com variação de 0 a 17 pontos conforme a soma dos valores de risco relativo encontrados.

A partir de então, classifica-se a taxa de sobrevida variando de acordo com a soma de pontos, onde 0 pontos (nenhum fator presente) corresponde a sobrevida em 5 anos de 100%; entre 3 e 14 pontos (dois fatores presentes) corresponde a sobrevida em 5 anos de 85,3%; e com mais do que 14 pontos

(todos fatores simultâneos), corresponde a sobrevida em 5 anos de 31,4% (Log-rank: $p < 0,001$).

Desta forma propõe-se uma classificação prognóstica para pacientes portadoras de câncer de vulva com base na análise multivariada de fatores da população estudada. Esta classificação leva em conta o tamanho, a profundidade de invasão e a expressão da MMP 2 avaliada por imunohistoquímica do tumor. De acordo com as características presentes, o prognóstico seria identificado conforme as três classes descritas acima.

Em relação às limitações do estudo pode-se relatar a sua realização em uma única instituição, o que pode limitar os achados a uma população específica e não ter aplicado o escore em uma amostra de pacientes tratadas em outra instituição. O período de estudo compreendido corresponde a 18 anos e, embora o tratamento da instituição seja padronizado, houve mudança de profissionais ao longo do tempo no serviço de assistência. Nesse período a radioterapia manteve a padronização de protocolos de tratamento, porém houve atualização de aparelhos. A associação de quimioterapia durante a radioterapia no tratamento pós-operatório não mostra dados definitivos na literatura sobre os reais benefícios na sobrevida. A quimioterapia é utilizada no Hospital Aristides Maltez desde 2006 e carece de estudos prospectivos e randomizados para estabelecer sua real influência nos resultados.

CONCLUSÕES

---

6 CONCLUSÕES

- Os fatores tamanho do tumor maior de 4 centímetros no maior diâmetro, invasão do estroma pelo tumor maior de 2 milímetros e expressão de MMP2 presente em mais de cinquenta por cento das células tumorais avaliadas pela imunohistoquímica, foram relacionados de forma independente à menor taxa de sobrevida global nas pacientes portadoras de câncer de vulva estudadas, pela análise multivariada.
- Propõe-se uma classificação prognóstica de sobrevida global para pacientes portadoras de câncer de vulva com base no resultado da análise multivariada. Os fatores que a compõem são o tamanho maior de 4 centímetros, profundidade de invasão maior de 2 milímetros e expressão da MMP 2 presente em mais de 50% das células do tumor avaliadas pelo método de imunohistoquímica do tumor e classificados pela contagem de pontos relacionada ao valor do risco relativo. A contagem de pontos identifica três grupos com sobrevida global distintas.

ANEXOS

---

7 ANEXOS

Anexo A - ficha de avaliação dos casos:

Dados Pessoais:

Paciente:
 Matrícula:
 Data de nascimento:
 Idade:
 Cor-raça: Parda ( ) Branca ( ) Negra ( ) Amarela ( ) Índio ( )
 Primeira relação sexual - idade:
 Hipertensão: Sim ( ) Não ( )
 Diabetes: Sim ( ) Não ( )
 Tabagismo: Sim ( ) Não ( )

Tamanho do tumor ao exame clínico:

Localização do tumor: Clitóris ( ) Fúrcula ( ) Grande lábio direito ( )
 Pequeno lábio direito ( ) Pequeno lábio esquerdo ( )
 Grande lábio esquerdo ( )
Suspeita clínica de metástases em linfonodo: Direita ( ) Esquerda ( )
 Não ( ) Nódulo ( ) Massa > 2cm ( )

Anatomia Patológica:

Número do exame:
Data da Cirurgia:
Data da alta hospitalar:
Histologia: carcinoma escamocelular ( ) Outros ( )
Tamanho do tumor:
Linfonodos retirados: Sim ( ) Não ( )

Direta	Numero ( )	Positivo ( )	Negativos ( )
Esquerda	Numero ( )	Positivo ( )	Negativos ( )

 Menor Margem:
Tipo da Cirurgia: Ressecção ampla ( ) Incisão tripla ( ) Grande lábio direito ( )
 Incisão única radical ( ) Linfadenectomia ( ) Seletiva ( )
 Incisão central e outra de linfadenectomia ( ) Radical ( )
Complicações Cirúrgicas: Deiscência ( ) Infecção ( ) Trombose venosa ( )
 Sangramento ( ) Reoperação ( ) Seletiva ( )
 Incisão central e outra de linfadenectomia ( ) Radical ( )
Tratamento adjuvante: Radioterapia ( ) Quimioterapia ( )
Recidiva data:
Tratamento da recidiva: Radioterapia ( ) Quimioterapia ( ) Cirurgia ( )
Data da última consulta:

Estado clínico:

Morto pela doença ( ) vivo com doença ( ) perdido de vista com doença ( )
 morto por outras causas ( ) vivo sem doença ( ) perdido de vista sem doença ( )

Anexo B –Microfotografias.

Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo p53. (aumento X 10)

Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-MMP 2 negativo inflamatório positivo (aumento X100)

Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-MMP 2 positivo (aumento X100)

Anexo C – Comitê de ética em pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/05/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **323/10** intitulado: **“ESTUDO DE FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS E BIOMOLECULARES DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE VULVA SUBMETIDOS A TRATAMENTO CIRÚRGICO”** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E ONCOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Fernando Augusto Soares

Pesquisador (a) Executante: Paulo Henrique Zanvettor

CEP-FMUSP, 12 de Maio de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 13 de Agosto de 2010.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1442/10
“Estudo de fatores prognósticos clínicos e biomoleculares de pacientes portadores de câncer de vulva submetidos a tratamento cirúrgico”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/08/2010, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

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

1/1

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1442/10

Título: “Estudo de fatores prognósticos clínicos e biomoleculares de pacientes portadores de câncer de vulva submetidos a tratamento cirúrgico”.

Pesquisador Responsável: Dr. Fernando Augusto Soares

Instituição Vinculada: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aluno: Paulo Henrique Zanvettor (Mestrado)

Patrocinador: N/A.

Comentários gerais:

Projeto de mestrado de aluno vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com a finalidade de avaliar os fatores clínicos, patológicos e a expressão imunoistoquímica dos fatores envolvidos nos processos de invasão e metástase em carcinomas de células escamosas da vulva, através de imunoistoquímica para E-caderina, VEGF, FGF, p53 e metaloproteinases 2 e 9, através da técnica de tissue microarray.

Adequação do título: Adequado.

Adequação da revisão de literatura: Adequada.

Adequação dos objetivos frente à literatura: Vide parecer da Comissão de Pesquisa.

Desenho e metodologia do projeto (grupos experimentais, procedimentos, indicadores de resultado, tipo de estudo, fase da pesquisa):

Será feita análise retrospectiva de pacientes submetidos à cirurgia para carcinoma de células escamosas da vulva, com ou sem linfadenectomia regional, no Hospital Aristides Maltez, no período de 1995 a 2010.

Os dados clínicos serão levantados a partir dos prontuários médicos, e os blocos de parafina serão obtidos do Departamento de Anatomia Patológica, sendo selecionados os casos com material disponível para construção do tissue microarray.

Critérios de inclusão:

Pacientes do sexo feminino portadoras de carcinoma de células escamosas da vulva, submetidas a vulvectomia com ou sem linfadenectomia regional, com material arquivado suficiente para a condução do estudo.

Critérios de exclusão:

Pacientes sem seguimento adequado; com segundo tumor primário, do mesmo tipo histológico; que tenham realizado tratamento neoadjuvante; que não possuam material disponível para a condução do estudo.

Riscos e benefícios aos sujeitos: Não se aplica.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Foi solicitado dispensa de apresentação de TCLE específico por se tratar de pesquisa baseada em levantamento de dados junto a prontuário médico e arquivo de blocos de parafina.

Análise crítica de riscos: não há.

Duração total da pesquisa: 8 meses.

Explicitação das responsabilidades:

- **do pesquisador:** se compromete a cumprir as Resoluções do Conselho Nacional de Pesquisa.
- **do patrocinador:** não se aplica.

Explicitação dos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: Não se aplica.

Local de pesquisa: Hospital Aristides Maltez e Hospital A.C. Camargo.

Fonte financeira: Os custos serão cobertos pelos investigadores e pelo Departamento de Anatomia Patológica.

Análise da Comissão de Pesquisa: Aprovado.

- Projeto relevante e de interesse com casuística significativa (>100 casos), entretanto no projeto o pesquisador elencou um grande número de objetivos, incluindo o próprio método (TMA), que não é o foco do estudo. Sugere-se corrigir e adequar os objetivos ao estudo proposto.

Comentários Finais:

Projeto de mestrado de fácil execução e passível de ser finalizado, atingindo os objetivos no tempo proposto para a sua execução. Não há contra-indicações do ponto de vista ético.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.

 FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
 Hospital A. C. Camargo
 Comissão Ética em Pesquisa
 Dr. Jefferson Luiz Gross
 1º Vice-Coordenador

LIGA BAHIANA CONTRA O CÂNCER

23/03

Salvador, 2 de junho de 2003.

Dr. Paulo Henrique Zanvettor, Pesquisador,
HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ

Senhor Pesquisador,

O projeto intitulado de V.S^o " Estudo epidemiológico, clinico de determinantes prognósticos em tumores de vulva " sob nº45/03, foi aprovado pelo CEP, em reunião de 26 de maio, com as três pendências seguintes:

1. V.S^a deverá obter do Serviço de Anatomia Patológica, autorização para manusear o material sob a guarda desse serviço;
2. V.S^a deverá descrever quem fará a análise desse material, identificando a (as) pessoa (as), bem como, suas qualificações;
3. V.S^a deverá declarar quem pagará os custos com os testes necessários.

Terá V.S^a , os termos dos regulamento de 60 dias no máximo, para juntar as folhas correspondentes aos requisitos acima.

Cordialmente,

Dr. Artur Ventura de Mates
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

AVM/isj

LIGA BAHIANA CONTRA O CâNCER - LBCC
Comitê de Ética em Pesquisa Artur Ventura de Matos

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que consta do **Livro de Atas nº 01 página 056**, do Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Bahiana Conta o Câncer – Hospital Aristides Maltez, o registro da apreciação e aprovação do **Projeto de Pesquisa CEP LBCC/HAM nº 045/2003** intitulado: **“Estudo epidemiológico, clínico de determinantes prognósticos em tumores de vulva”**, em Reunião do Comitê ocorrida em 30 de junho de 2003, tendo como pesquisador responsável o senhor **Paulo Henrique Zanvettor**.

Salvador, 10 de setembro de 2013.

Adm. Maria Guilhermina de Almeida R. Dantas Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
LBCC/HAM

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Afandy AE, Soliman H, Sherbiny ME, Elkasem HA. Groin recurrence in patients with early vulvar cancer following superficial inguinal node dissection. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2013 Sep;25(3):121-4.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Yukie Sato, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J Bras Patol Med Lab*, 2007;43(1):55-60.

Ayhan A, Velipasaoglu M, Salman MC, Guven S, Gultekin M, Bayraktar O. Prognostic factors for recurrence and survival in primary vulvar squamous cell cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(11):1143-9.

Baiocchi G, Cestari FM, Rocha RM, Faloppa CC, Kumagai LY, Fukazawa EM, Badiglian-Filho L, Cestari LA, Rodrigues IS, Lavorato-Rocha A, Maia BM, Soares FA. Does the count after inguinofemoral lymphadenectomy in vulvar cancer correlate with outcome? *Eur J Surg Oncol.* 2013 Apr;39(4):339-43. doi: 10.1016/j.ejso.2013.02.012. Epub 2013 Feb 17.

Baiocchi G, Silva Cestari FM, Rocha RM, Lavorato-Rocha A, Maia BM, Cestari LA, Kumagai LY, Faloppa CC, Fukazawa EM, Badiglian-Filho L, Sant'ana Rodrigues I, Soares FA. Prognostic value of the number and laterality of metastatic inguinal lymph nodes in vulvar cancer: revisiting the FIGO staging system. *Eur J Surg Oncol.* 2013 Jul;39(7):780-5

Blecharz P, Karolewski K, Bieda T, Klimek M, Pudelek J, Kojs E, Zur K, Dzialak P, Urbanski K. Prognostic factors in patients with carcinoma of the vulva--our own experience and literature review. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(3):260-3.

Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer Causes Control.* 2009 Nov;20(9):1779-82

Böhlig L, Rother K. One function—multiple mechanisms: the manifold activities of p53 as a transcriptional repressor. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011, p. 162.

102

Bosquet G, Kinney WK, Russell AH, Gaffey TA, Magrina JF, Podratz KC. Risk of occult inguinofemoral lymph node metastasis from squamous carcinoma of the vulva. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Oct 1;57(2):419-24.

Bovo AC, da Silva ID, Takita LC, Fochi J, Stávale JN, Marks G, de Lima GR. A comparative study of MMP-2 in vulvar neoplasms. *Gynecol Oncol.* 2004 May;93(2):454-7.

Boyce J, Fruchter RG, Kasambilides E, Nicastrì AD, Sedlis A, Remy JC. Prognostic factors in carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol*. 1985 Mar;20(3):364-77.

Bozanovic T, Ljubic A, Momcilov P, Milicevic S, Mostic T, Petkovic S. Survival rate and prognostic factors for patients who underwent surgical procedures for invasive carcinoma of the vulva in Serbia. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007;28(6):477-9.

Branca, M., Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K; HPV-PathogenISS Study Group. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res*. 2006 Mar-Apr;26(2B):1543-56.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil dados dos registros de base populacional. Rio de Janeiro, INCA, 2003:3.

BRASIL. Ministério da Saúde. ESTIMATIVA, I. N. C. A. Incidência de Câncer no Brasil.[Internet].[cited 2012 Jun 19]. Available from:< www.inca.gov.br/estimativa/2010>. 2012.

Burger MP, Hollema H, Emanuels AG, Krans M, Pras E, Bouma J. The importance of the groin node status for the survival of T1 and T2 vulval carcinoma patients. *Gynecol Oncol*. 1995 Jun;57(3):327-34.

Buscema J, Stern JL, Woodruff JD. Early invasive carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol*. 1985 Sep;66(3):402-5. *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Jul 1;140(5):563-9.

103

Butler JS, Milliken DA, Dina R, Eccles SA, Maghami SG, Jameson C, Mason P, Shepherd JH, Soutter WP, Barton DP. Isolated groin recurrence in vulval squamous cell cancer (VSCC). The importance of node count. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(5):510-3.

Chan JK, Sugiyama V, Pham H, Gu M, Rutgers J, Osann K, Cheung MK, Berman ML, Disaia PJ. *Gynecol Oncol*. Margin distance and other clinico-pathologic prognostic factors in vulvar carcinoma: a multivariate analysis. 2007 Mar;104(3):636-41.

Courtney-Brooks M, Sukumvanich P, Beriwal S, Zorn KK, Richard SD, Krivak TC. Does the number of nodes removed impact survival in vulvar cancer patients with node-negative disease? *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2):308-11.

Diego OJB, Almanza RD, León JFM, Noa RPE, Pablos JMS, Francisco Orlando Aguilar Vela de Oro FOAV. Cáncer de la vulva: cuadro clínico, histopatología y supervivencia (1980 a 2004). *Rev Cubana Cir.* 2008;47(4).

DiSaia PJ, Creasman WT. *Clinical gynecologic oncology*. 7o. Philadelphia: Elsevier, 2007.

Donaldson ES, Powell DE, Hanson MB, van Nagell JR Jr. Prognostic parameters in invasive vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 1981 Apr;11(2):184-90.

Dvoretzky PM, Bonfiglio TA, Helmkamp BF, Ramsey G, Chuang C, Beecham JB. The pathology of superficially invasive, thin vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 1984;3(4):331-42.

Emanuels AG, Koudstaal J, Burger MP, Hollema H. In squamous cell carcinoma of the vulva, overexpression of p53 is a late event and neither p53 nor mdm2 expression is a useful marker to predict lymph node metastases. *Br J Cancer.* 1999 Apr;80(1-2):38-43.

Emanuels AG, Koudstaal J, Burger MP, Hollema H. In squamous cell carcinoma of the vulva, overexpression of p53 is a late event and neither p53 nor mmp2 expression is a useful marker to predict lymph node metastases. *Br J Cancer.* 1999 Apr;80(1-2):38-43.

104

Engelman DE, Andrade LA, Vassallo J. Human papillomavirus infection and p53 protein expression in vulvar intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res.* 2003 Sep;36(9):1159-65.

Fosp, F. O. D. S. P. Fundação Oncocentro de São Paulo - Acesso ao Banco de Dados* - RHC. São Paulo, 2011. Disponível em: < http://www.fosp.saude.sp.gov.br/epidemiologia/dados_rhc.html >.

Fu YS, Reagan JW, Townsend DE, Kaufman RH, Richart RM, Wentz WB. Nuclear DNA study of vulvar intraepithelial and invasive squamous neoplasms. *Obstet Gynecol.* 1981 May;57(5):643-52.

Gadducci A, Ferrero A, Tana R, Fabrini MG, Modaffari P, Fanucchi A, Vignati C, Zola P. Prognostic value of lymph node status and number of removed nodes in patients with squamous cell carcinoma of the vulva treated with modified radical vulvectomy and inguinal-femoral lymphadenectomy. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2012;33(6):640-3.

Gonzalez Bosquet J, Kinney WK, Russell AH, Gaffey TA, Magrina JF, Podratz KC. Risk of occult inguinofemoral lymph node metastasis from squamous carcinoma of the vulva. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Oct 1;57(2):419-24.

Görögh T, Beier UH, Bäumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, Maune

S. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2006 Jan;28(1):31-9.

Hampl M, Deckers-Figiel S, Hampl JA, Rein D, Bender HG. New aspects of vulvar cancer: changes in localization and age of onset. *Gynecol Oncol*. 2008 Jun;109(3):340-5.

Hanprasertpong J, Chichareon S, Wootipoom V, Buhachat R, Tocharoenvanich S, Geater A. Clinico-pathological profile of vulva cancer in southern Thailand: analysis of 66 cases. *J Med Assoc Thai*. 2005 May;88(5):575-81.

105

Hoffman JS, Kumar NB, Morley GW. Prognostic significance of groin lymph node metastases in squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol*. 1985 Sep;66(3):402-5.

Hopkins MP, Reid GC, Johnston CM, Morley GW. A comparison of staging systems for squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol*. 1992 Oct;47(1):34-7.

Homesley HD, Bundy BN, Sedlis A, Yordan E, Berek JS, Jahshan A, Mortel R. Prognostic factors for groin node metastasis in squamous cell carcinoma of the vulva (a Gynecologic Oncology Group study) *Gynecol Oncol*. 1993 Jun;49(3):279-83.

Homesley HD, Bundy BN, Sedlis A, Yordan E, Berek JS, Jahshan A, Mortel R. Assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging of vulvar carcinoma relative to prognostic factors for survival (a Gynecologic Oncology Group study). *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Apr;164(4):997-1003

Hopkins MP, Reid GC, Johnston CM, Morley GW. A comparison of staging systems for squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol*. 1992 Oct;47(1):34-7.

Howlader N, Noone A M, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse S F & Cronin K A. (2012). SEER cancer statistics review, 1975–2009 (vintage 2009 populations). Bethesda, MD: National Cancer Institute.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2013.

Iacoponi S, Zapardiel I, Diestro MD, Hernandez A, De Santiago J. Prognostic

factors associated with local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2013 Jul;24(3):242-8.

106

Iversen T. Squamous cell carcinoma of the vulva. Localization of the primary tumor and lymph node metastases. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1981;60(2):211-4.

Iversen T. The value of groin palpation in epidermoid carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 1981 Dec;12(3):291-5.

Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, Hermans J, Trimbos JB, Fleuren GJ. p53 protein overexpression is common and independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer.* 1997 Oct 1;80(7):1228-33.

Katayama A, Bando N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, Harabuchi Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):634-40.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67.

Kohlberger P, Kainz C, Breitenacker G, Gitsch G, Sliutz G, Kölbl H, Tschachler E, Reinthaller A. Prognostic value of immunohistochemically detected p53 expression in vulvar carcinoma. *Cancer.* 1995 Nov 15;76(10):1786-9.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):844-7.

Kouvaris JR, Kouloulis VE, Kondi-Pahpiti A, Kokakis JD, Vlahos LJ. Impact of inguinal dissection on prognosis of early-stage squamous cell carcinoma of the vulva--a retrospective analysis. *Onkologie.* 2003 Dec;26(6):564-7.

Lewy-Trenda I, Wierchniewska-Ławska A, Papierz W. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vulvar squamous cancer and VIN. *Pol J Pathol.* 2005;56(1):5-8.

107

Määtä M, Santala M, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Talvensaari-Mattila A. Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 expression is associated with progression from vulvar intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010 Mar;89(3):380-4.

- Magrina JF, Webb MJ, Gaffey TA, Symmonds RE. Stage I squamous cell cancer of the vulva. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Jun 15;134(4):453-9.
- Malfetano J, Piver MS, Tsukada Y. Stage III and IV squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 1986; Feb;23(2):192-8.
- McConnell DT, Miller ID, Parkin DE, Murray GI. p53 protein expression in a population-based series of primary vulval squamous cell carcinoma and immediate adjacent field change. *Gynecol Oncol.* 1997 Dec;67(3):248-54.
- Moore DH. Chemotherapy and radiation therapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the vulva: Are two therapies better than one? *Gynecol Oncol.* 2009 Jun;113(3):379-83
- Nicoletto MO, Parenti A, Del Bianco P, Lombardi G, Pedrini L, Pizzi S, Carli P, Della Palma M, Pastorelli D, Corti L, Becagli L. Vulvar cancer: prognostic factors. *Anticancer Res.* 2010 Jun;30(6):2311-7.
- Nola M, Blazanovic A, Dotlic S, Morovic A, Tomicic I, Jukic S. Invasive squamous cell carcinoma of vulva: prognostic significance of clinicopathologic parameters. *Croat Med J.* 2005 Jun;46(3):436-42.
- Paladini D, Cross P, Lopes A, Monaghan JM. Prognostic significance of lymph node variables in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer.* 1994 Nov 1;74(9):2491-6.
- Parthasarathy A, Cheung MK, Osann K, Husain A, Teng NN, Berek JS, Kapp DS, Chan JK. The benefit of adjuvant radiation therapy in single-node-positive squamous cell vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2006 Dec;103(3):1095-9.
- 108
- Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009 May;105(2):103-4.
- Piura B, Rabinovich A, Cohen Y, Friger M, Glezerman M. Squamous cell carcinoma of the vulva in the south of Israel: a study of 50 cases. *J Surg Oncol.* 1998 Mar;67(3):174-81.
- Podratz KC, Symmonds RE, Taylor WF. Carcinoma of the vulva: analysis of treatment failures. *Am J Obstet Gynecol.* 1982 Jun 1;143(3):340-51.
- Raspagliesi F, Hanozet F, Ditto A, Solima E, Zanaboni F, Vecchione F, Kusamura S. Clinical and pathological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2006 Aug;102(2):333-7.
- Rosenthal AN, Hopster D, Ryan A, Jacobs IJ. Immunohistochemical analysis of p53 in vulval intraepithelial neoplasia and vulval squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003 Jan 27;88(2):251-6.

Rosenthal EL, Johnson TM, Allen ED, Apel IJ, Punturieri A, Weiss SJ. Role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in epidermal growth factor- and scatter factor-stimulated invasion of carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5221-30.

Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck.* 2006 Jul;28(7):639-48.

Rowley KC, Gallion HH, Donaldson ES, van Nagell JR, Higgins RV, Powell DE, Kryscio RJ, Pavlik EJ. Prognostic factors in early vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 1988 Sep;31(1):43-9.

Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5287-97.

Rutledge FN, Mitchell MF, Munsell MF, Atkinson EN, Bass S, McGuffee V, Silva E. Prognostic indicators for invasive carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 1991 Sep;42(3):239-44.

109

Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol.* 2004 Nov 22;167(4):769-81.

Salmaso R1, Zen T, Zannol M, Perin D, Marchiori S, Marchetti M. Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2000;21(5):479-83.

Sarian LOZ, Marshall OS, Derchain SFM, Torres JCC, Santos ACP, Souza GA. Invasão linfática clinicamente não detectável do câncer vulvar. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2005 jul-ago, 51(4):228-32

Scheistrøen M, Tropé C, Pettersen EO, Nesland JM. p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer.* 1999 Mar 1;85(5):1133-8.

Sedlis A, Homesley H, Bundy BN, Marshall R, Yordan E, Hacker N, Lee JH, Whitney C. Positive groin lymph nodes in superficial squamous cell vulvar cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Am J Obstet Gynecol.* 1987 May;156(5):1159-64.

Shimada T, Nakamura H, Yamashita K, Kawata R, Murakami Y, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(2):179-88.

Shylasree TS, Bryant A, Howells RE. Chemoradiation for advanced primary vulval cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Apr 13;(4).

Smyczek-Gargya B, Volz B, Geppert M, Dietl J. A multivariate analysis of clinical and morphological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Obstet Invest*. 1997;43(4):261-7.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. *Virchows Arch*. 2006 Dec;449(6):637-46.

110

Stankevica J, Macuks R, Baidekalna I, Donina S. Midline involvement as a risk factor for vulvar cancer recurrence. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):5237-40.

Stroup AM, Harlan LC, Trimble EL. Demographic, clinical, and treatment trends among women diagnosed with vulvar cancer in the United States. *Gynecol Oncol*. 2008 Mar;108(3):577-83.

Stuckey A, Schutzer M, Rizack T, Dizon D. Locally advanced vulvar cancer in elderly women: is chemoradiation beneficial? *Am J Clin Oncol*. 2013 Jun;36(3):279-82.

Sun X, Zhang Y, Sun J, Feng S, Yan M, Cheng H. The comparative study of former and latest FIGO staging of vulva cancer. *Minerva Chir*. 2012 Apr;67(2):187-95.

Tantipalakorn C, Robertson G, Marsden DE, Gebiski V, Hacker NF. Outcome and patterns of recurrence for International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stages I and II squamous cell vulvar cancer.. *Obstet Gynecol*. 2009 Apr;113(4):895-901. doi: 10.1097/AOG.0b013e31819b413f.

Tombolini V, Raffetto N, Santarelli M, Valeriani M, Necozone S, Masedu F, Enrici RM. Carcinoma of the vulva: clinical results of exclusive and adjuvant radiotherapy. *Anticancer Res*. 2005 Jul-Aug;25(4):3089-94.

Van der Steen S, de Nieuwenhof HP, Massuger L, Bulten J, de Hullu JA. New FIGO staging system of vulvar cancer indeed provides a better reflection of prognosis. *Gynecol Oncol*. 2010 Dec;119(3):520-5.

Wilkinson EJ, Rico MJ, Pierson KK. Microinvasive carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol*. 1982;1(1):29-39.

Woelber L, Eulenburg C, Choschick M, Kruell A, Petersen C, Giesecking F, Jaenicke F, Mahner S. Prognostic role of lymph node metastases in vulvar cancer and implications for adjuvant treatment. *Int J Gynecol Cancer*. 2012

Mar;22(3):503-8.

111

Woelber L, Mahner S, Voelker K, Eulenburg CZ, Giesecking F, Choschzick M, Jaenicke F, Schwarz J. Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. *Anticancer Res.* 2009 Feb;29(2):545-52.

Xu LQ, Luo RZ, Sun XM, He JH, Zhang YN. Prognostic analysis of early-stage squamous cell carcinoma of the vulva. *World J Surg Oncol.* 2013 Jan 26;11:20.

Xu LQ¹, Luo RZ, Sun XM, He JH, Zhang YN. Prognostic analysis of early-stage squamous cell carcinoma of the vulva. *World J Surg Oncol.* 2013 Jan 26;11:20. doi: 10.1186/1477-7819-11-20.

Yoder BJ, Rufforny I, Massoll NA, Wilkinson EJ. Stage IA vulvar squamous cell carcinoma: an analysis of tumor invasive characteristics and risk. *Am J Surg Pathol.* 2008 May;32(5):765-72.

Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2001 Jan 20;95(1):44-50.

Zhang ZY. Analysis of 79 cases of the radical vulvectomy for primary malignant tumors of vulva (author's transl. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1981 Jul;16(3):175-7.