



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa
Programa de Mestrado em Genética



DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV EM CARCINOMAS DE VULVA E DE VAGINA

Mestranda: Tatiane Ribeiro da Fonseca
Orientadora: Dra. Vera Aparecida Saddi

Goiânia
2014



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa
Programa de Mestrado em Genética



DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV EM CARCINOMAS DE VULVA E DE VAGINA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Mestranda: Tatiane Ribeiro da Fonseca
Orientadora: Dra. Vera Aparecida Saddi

Goiânia
2014



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE GRADUAÇÃO

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-910
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946 1021 • Fax: (62) 3946 1397
www.pucgoias.edu.br • prograd@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 91/2014

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: TATIANE RIBEIRO DA FONSECA

DEFENDIDA EM 26 DE JUNHO DE 2014 E aprovada COM CONCEITO A

O título foi alterado (X) não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Vera Aparecida Saddi

Profª. Dra. Vera Aparecida Saddi
(Presidente-orientador)

Flávia

Profª. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás
(membro interno)

Silvia Santos

Profª. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos / UFG
(Membro externo)

Dedico este trabalho...

Ao meu marido Fúlvio Hendrigo que me deu
asas para que eu alçasse voo em busca da
realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Sempre que eu lia um trabalho com o nome de tantos autores, imaginava que aquilo se parecia mais com uma parceria do que com um trabalho feito em grupo. Afinal, eu não sabia quanta gente era necessária para o desenvolvimento de um projeto.

Eu agradeço primeiramente a Deus porque acredito que foi Ele quem me deu força nos momentos em que eu pensava que não ia conseguir realizar um experimento, ou conciliar as tarefas do dia-a-dia com as idas e vindas à universidade. Agradeço por Ele ter me protegido durante esse período. Mas agradeço principalmente por Ele ter preparado essa oportunidade de realizar meu sonho.

Agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram e respeitaram minhas escolhas e principalmente minha mãe, por estar sempre ao meu lado, mesmo que fisicamente distante.

Agradeço ao meu marido Fúlvio Hendrigo pela força, compreensão, empatia e amor durante esse período difícil para nós em vários aspectos. Mesmo com as dificuldades, ele jamais permitiu que eu esmorecesse ou pensasse em desistir. Ele foi meu conforto e apoio em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Vera Saddi por permitir que eu trabalhasse com ela pela segunda vez. Nossa relação tem me proporcionado um grande crescimento cultural e pessoal.

Agradeço à equipe de vigilância da área V da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, principalmente aos porteiros Genildo, Sullivan, Ronivaldo e Keila. Me perdoem aqueles de quem não me lembro o nome, mas a compreensão com meus horários de trabalho e a enorme gentileza com que me trataram durante esse período, jamais será esquecida. Agradeço à equipe de manutenção e limpeza do mesmo *campus*, pela simpatia, pelo cafezinho que me mantinha estimulada e pela compreensão com minha bagunça quando eu usava a máquina de gelo e a sala da autoclave.

Agradeço à Coordenação do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por permitir o uso dos laboratórios para a realização da parte prática deste trabalho. E ao secretário Jader, por doar parte de seu tempo providenciando material laboratorial e autorizações para o acesso à universidade nos finais de semana.

Meus sinceros agradecimentos ao secretário do Laboratório de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge, Ricardo Silva, pelos diversos favores prestados em prol da realização deste trabalho. Agradeço à equipe do Setor de Arquivo Médico que tão prontamente atendia às minhas solicitações dos prontuários das pacientes. Agradeço em especial à simpática Marilene, responsável pelo arquivo de blocos de parafina. Agradeço também à equipe do Setor de Anatomia Patológica pela disponibilidade dos livros de registro e laudos médicos e principalmente à Karla Cordeiro, que preparou as amostras utilizadas neste trabalho.

Agradeço à Dra. Jalsi Tacon Arruda que se prontificou a me auxiliar com a estatística do trabalho e me deu um grande apoio didático e emocional, conquistando minha amizade e eterna gratidão.

Agradeço aos meus colegas do mestrado que se tornaram grandes amigos: Caio Bruno Quinta de Souza Leal e Guilherme Petito. Esses dois me ajudaram tanto com palavras de incentivo quanto com práticas laboratoriais.

E, falando em amizade, agradeço pela companhia e os ensinamentos da Brhuna Carla Cunha Rodrigues e pelos cuidados e conselhos da profissional de enfermagem e minha amiga Joyce Palma Andrade. Afinal de contas, ninguém consegue conciliar vidas profissionais e pessoais sem o conforto de uma boa amizade!

Agradeço às alunas de iniciação científica Clerlhan Ferreira de Lira por me auxiliar nas primeiras extrações de DNA e Jacqueline Teixeira por me auxiliar em toda a parte prática desta pesquisa. A convivência com uma pessoa dinâmica, solícita e humilde como a Jacqueline restaurou minha fé nas pessoas.

Agradeço à Secretária do Mestrado em Genética, Alessandra Malta, por desenvolver tão bem seu trabalho mesmo que em pouco tempo de serviço e por atender com tão boa vontade às solicitações dos mestrandos.

Agradeço, enfim, a todos aqueles que me apoiaram de alguma forma e que acreditaram em mim. Afinal, eu percebi várias pessoas participam de forma direta e indireta de um trabalho científico, mesmo que não façam ideia disso!!!

SUMÁRIO

Dedicatória	III
Agradecimentos	IV
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Anexos	X
Lista de Abreviaturas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XIV
1. Introdução	15
1.1. Tumores de Vulva	15
1.2. Tumores de Vagina	18
1.3. História Natural dos Tumores de Vulva e de Vagina	19
1.4. Etiologia dos Tumores de Vulva e de Vagina	21
1.5. Epidemiologia dos Tumores de Vulva e de Vagina	22
1.6. HPV e a Carcinogênese	24
1.7. Genética dos Tumores de Vulva e de Vagina	28
1.8. Fatores Prognósticos dos Tumores de Vulva e de Vagina	31
1.9. Tratamento dos Tumores de Vulva e de Vagina	34
1.10. Detecção do HPV nos Tumores de Vulva e de Vagina	37
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. Material e Métodos	41
3.1. Aspectos Éticos	41
3.2. Casuística	41
3.3. Confirmação Histopatológica do Diagnóstico de Câncer de Vulva e de Vagina	42
3.4. Análises Moleculares	42
3.4.1. Extração do DNA das Amostras de Câncer de Vulva e de Vagina	43
3.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	43
3.4.3. Eletroforese	46
3.5. Análises dos Dados	46
4. Resultados	47

4.1. Características Clinicopatológicas e Sociodemográficas das Pacientes com Câncer de Vulva e de Vagina	47
4.2. Detecção do HPV e Genotipagem dos HPV16 e 18 nas Amostras de Câncer de Vulva e de Vagina	50
5. Discussão	54
6. Conclusões	58
7. Referências Bibliográficas	59
8. Anexos	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia Vulvar	15
Figura 2. Tecido Epitelial Vulvar	16
Figura 3. Carcinomas de Células Escamosas. A. Queratinizante. B. Verrucoso. C e D. Basalóide	17
Figura 4. Anatomia Vaginal	19
Figura 5. Genoma do HPV	24
Figura 6. Infecção e proliferação do HPV nas células epiteliais	26
Figura 7. Integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro	26
Figura 8. Ativação da proliferação celular desencadeada pelas proteínas do HPV	27
Figura 9. Vulvectomy Radical. A. CEC vulvar nos lábios direitos, avançando para o clitóris. B. Vulvectomy com linfadenectomia inguinal bilateral.....	35
Figura 10: Esquema do levantamento casuístico	41
Figura 11: Distribuição dos locais de metástase à distância (n= 13 casos) dos tumores de vulva em pacientes atendidas no Hospital Araújo Jorge entre Janeiro de 2005 e Julho de 2013	49
Figura 12. Distribuição dos locais de metástase à distância (n= 7 casos) dos tumores de vagina em pacientes atendidas no Hospital Araújo Jorge entre Janeiro de 2005 e Julho de 2013	49

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Estadiamento TNM e FIGO dos tumores de vulva	32
Tabela II. Estadiamento TNM e FIGO dos tumores de vagina	32
Tabela III. Principais trabalhos publicados entre 2003 e 2013 que analisaram a prevalência do HPV em câncer de vulva	38
Tabela IV. Principais trabalhos publicados entre 2003 e 2013 que analisaram a prevalência do HPV em câncer de vagina	39
Tabela V. Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores do gene GAPDH para a confirmação da presença e integridade do DNA	44
Tabela VI. Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores SPF1/2 para a detecção do HPV	45
Tabela VII. Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de HPV16 e HPV18	45
Tabela VIII. Análise das características sociodemográficas das pacientes com câncer de vulva e de vagina	47
Tabela IX. Análise das características clinicopatológicas das pacientes com câncer de vulva e de vagina	48
Tabela X. Análise dos dados clinicoepidemiológicos e sociodemográficos das pacientes com câncer de vulva em relação à prevalência do HPV e dos genótipos HPV16 e 18	51
Tabela XI. Análise dos dados clinicoepidemiológicos e sociodemográficos das pacientes com câncer de vagina em relação à prevalência do HPV e dos genótipos HPV16 e 18	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética	70
Anexo II: Ficha das pacientes	73
Anexo III: Protocolo de desparafinização e extração do DNA	75
Anexo IV: Protocolo da mistura dos reagentes para PCR e das termociclagens	77
Anexo V: Protocolos de confecção do gel, do tampão de amostra e de coloração ...	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Adenocarcinoma
CDK	Quinase dependente de ciclina
CEC	Carcinoma espinocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dp	Desvio padrão
E	Do inglês <i>early</i> (cedo, região genômica do HPV que codifica as proteínas que são expressas primeiro)
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilendiamino tetraacético)
FIGO	Do francês <i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSIL	Do inglês <i>high grade squamous intraepithelial lesion</i> (lesão intraepitelial escamosa de alto grau)
HPV	Papillomavírus humano (ou do inglês <i>human papillomavirus</i>)
IL-1β	Interleucina 1 β
ISSVD	Do inglês <i>International Society for the Study of Vulvar Disease</i>
L	Do inglês <i>late</i> (tarde, região genômica do HPV que codifica as proteínas do capsídeo viral, que são expressas por último)
LCR	Do inglês <i>Long Control Region</i>
LSIL	Do inglês <i>low grade squamous intraepithelial lesion</i> (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau)
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical

NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
NIVa	Neoplasia intraepitelial vaginal
Pb	Pares de base
PCR	Do inglês <i>polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PUC-Go	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
SEER	Do inglês <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SPF	Do inglês <i>short PCR fragmente</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEM	Transição epitélial-mesenquimal
TNM	T= tumor primário, N= Linfonodo regional, M= Metástase à distância
UV	Ultravioleta
µL	Microlitro, unidade de medida de volume, a milésima parte de um mililitro
µm	Micrômetro, unidade de medida de área, a milésima parte de um centímetro

RESUMO

O presente estudo avaliou os aspectos sociodemográficos e clinicopatológicos de pacientes com câncer de vulva e vagina diagnosticadas no Hospital Araújo Jorge, Goiânia/GO, bem como a prevalência do HPV e dos genótipos do HPV16 e 18 nesses tumores. A casuística consistiu de amostras parafinizadas de 57 pacientes com câncer invasor primário de vulva e 20 pacientes com câncer invasor primário de vagina. A detecção do HPV foi feita por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores SPF (do inglês *short PCR fragment*) 1/2 e a genotipagem do HPV16 e 18 foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores projetados para a detecção desses dois genótipos. Os resultados foram analisados por Teste Exato de Fisher. A prevalência do HPV nas amostras de câncer de vulva foi de 89%. O genótipo HPV16 foi detectado em 42% dos casos positivos e o HPV18 em 24%. A prevalência do HPV nas amostras de câncer de vagina foi de 90%. Dentre estas, 56% eram infecções pelo HPV16 e 18% pelo HPV18. Mais de 70% das pacientes com câncer de vulva e de vagina positivas para a detecção do HPV tinham mais de 50 anos. As análises estatísticas dos dados demonstraram significância do tabagismo para o câncer de vulva ($p=0,0110$). Uma relação entre metástase linfonodal e câncer de vulva também foi observada ($p=0,0304$). Um melhor prognóstico para pacientes com câncer de vagina HPV positivas foi constatado ($p=0,0158$). Uma relação entre o grau de diferenciação tumoral e a presença do HPV em pacientes com câncer de vulva foi sugerida ($p=0,0541$). Com base nos resultados apresentados, estima-se que a vacina contra o HPV poderia ter prevenido 58% dos casos de câncer de vulva e 65% dos casos de câncer de vagina da casuística investigada.

Palavras chave: câncer de vulva, câncer de vagina, HPV, HPV16, HPV18.

ABSTRACT

This study evaluated the sociodemographic and clinicopathological aspects of patients with cancer of the vulva and the vagina diagnosed in Araújo Jorge Hospital, Goiânia / GO as well as the prevalence of HPV and HPV16 and 18 genotypes in these tumors. The sample consisted of paraffin embedded samples from 57 patients with primary invasive vulvar cancer and 20 patients with primary invasive cancer of the vagina. The HPV detection was made by polymerase chain reaction (PCR) with SPF (short PCR fragment) 1/2 primers and the HPV 16 and 18 genotyping was performed with primers designed to detect these two genotypes. The results were analyzed by Fisher's exact test. The prevalence of HPV in vulvar cancer samples was 89%. The HPV16 genotype was detected in 42% of positive cases and HPV18 in 24%. The HPV prevalence in vaginal cancer samples was 90%. Among these, 56% were infections by HPV16 and HPV18 by 18%. Over 70% of patients with vulvar and vaginal cancer and positive for HPV detection were over 50 years. Statistical analyzes of the data showed significance of smoking for cancer of the vulva ($p = 0.0110$). A relationship between lymph node metastasis and cancer of the vulva was also observed ($p = 0.0304$). A better prognosis for patients with vaginal cancer HPV positive was found ($p = 0.0158$). A relationship between the degree of tumor differentiation and the presence of HPV in patients with cancer of the vulva was suggested ($p = 0.0541$). Based on the results presented, it is estimated that the HPV vaccine could have prevented 58% of cases of vulvar cancer and 65% of cases of vaginal cancer of the sample investigated.

Keywords: vulvar cancer, vaginal cancer, HPV, HPV16, HPV18.

1 - INTRODUÇÃO

1.1– Tumores De Vulva

A vulva corresponde à parte externa do aparelho reprodutor feminino. É composta por monte púbico, grandes lábios, pequenos lábios, hímen, clitóris, vestíbulo da vagina, orifício uretral, glândulas de Skene, glândulas de Bartholin e bulbos vestibulares (Figura 1) (DELIVELIOTOU e CREATSAS, 2006).

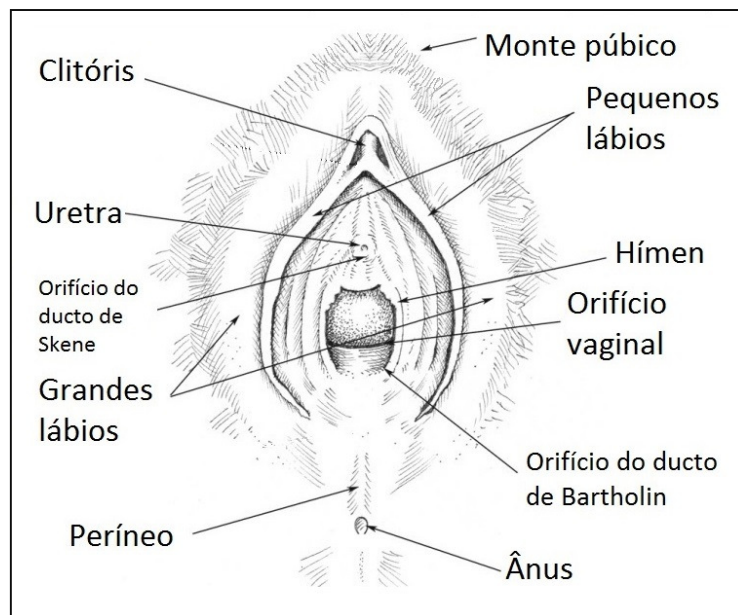


Figura 1: Anatomia vulvar (adaptado de SINGH, 2013).

O baixo trato genital é a única porção feminina derivada dos três folhetos embrionários. A pele vulvar possui uma estrutura epitelial escamosa estratificada queratinizada, com folículos pilosos e glândulas sebáceas (DELIVELIOTOU e CREATSAS, 2006). O epitélio cutâneo possui quatro camadas: a camada basal, a espinhosa, a granular e a superficial ou plana (Figura 2). Os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel são os três tipos de células especializadas encontradas no epitélio vulvar (FARAGE e MAIBACH, 2006). A diversidade estrutural dos tecidos vulvares explica a grande variedade de proliferações malignas que podem se desenvolver nesse local. A vulva é o quarto local mais comum de desenvolvimento de câncer ginecológico (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2009).

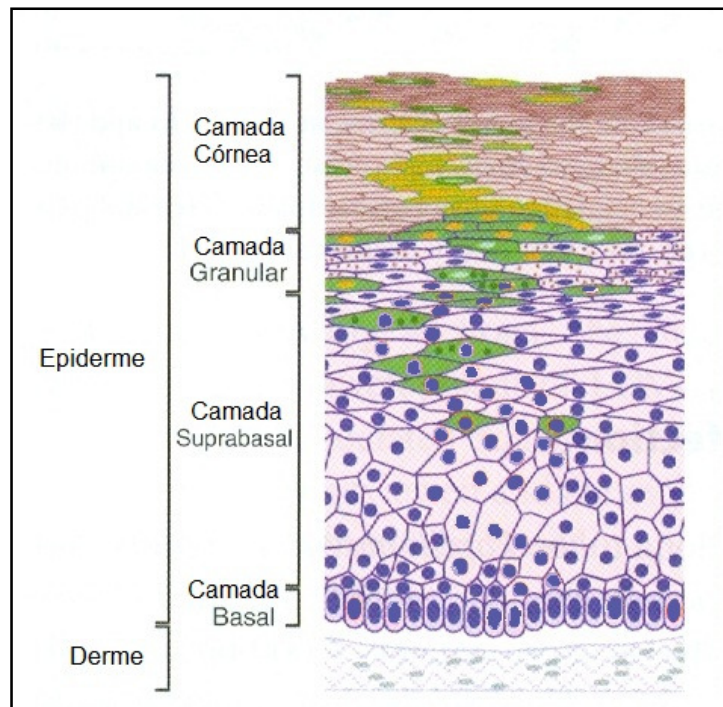


Figura 2 – Tecido epitelial vulvar (adaptado de OPARKA e HERRINGTON, 2013).

Histologicamente, os tumores vulvares são divididos em epiteliais (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003), mesenquimais (KEMPSON, TEIXEIRA, e HENDRICKSON, 2003), melanocíticos, de células germinativas, neuroectodermais e linfoides (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003). Aproximadamente 90% dos tumores vulvares malignos são carcinomas de células escamosas invasivos (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; SHUKLA *et al.*, 2009; DEMIRALAY *et al.*, 2012; DEL PINO *et al.*, 2013).

O carcinoma espinocelular (CEC) é um tumor epitelial composto por células em vários graus de diferenciação (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; BROWN, 2013). Os CEC são geralmente solitários e se apresentam em formas nodulares, verrucosas ou ulcerosas com bordas firmes em relevo. Os lábios são os locais mais acometidos da vulva (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; BROWN, 2013). O clitóris é o local de desenvolvimento do tumor em apenas 10% dos casos. A maioria dos sintomas se manifesta nos estádios mais avançados. O sintoma mais frequente é o prurido vulvar persistente e os demais incluem corrimento, sangramento, dor, odor ou formação de uma massa que pode ser notada pela paciente em um autoexame (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003).

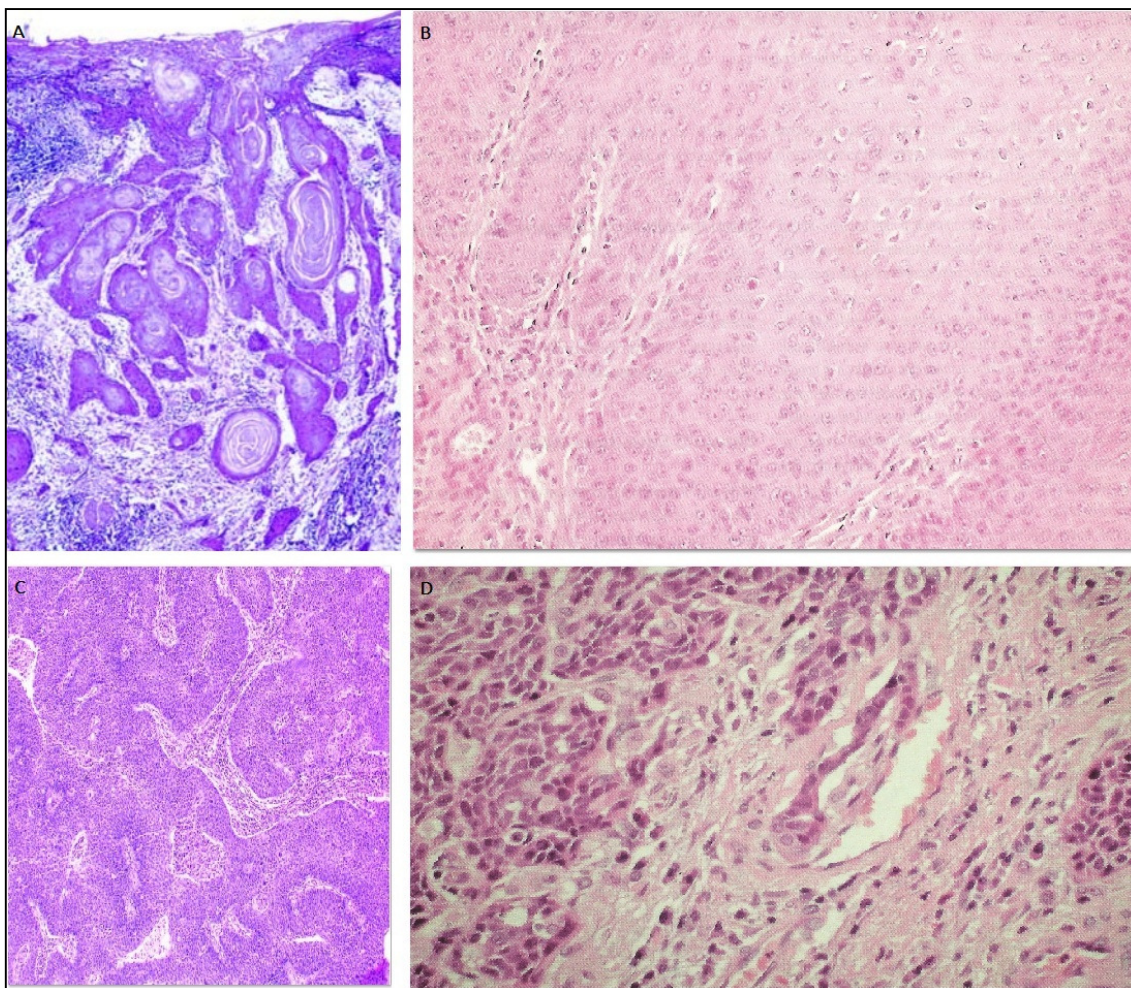


Figura 3 – Carcinomas de células escamosas. **A.** Queratinizante, **B.** Verrucoso, **C** e **D.** Basalóide (**A** e **C** adaptado de WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; **B** e **D** adaptado de BROWN, 2013).

O CEC vulvar progride por meio de duas vias: a neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada e a neoplasia intraepitelial vulvar usual (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; HOEVENAARS *et al.*, 2008; VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009; ALONSO *et al.*, 2011; RUMBOLD *et al.*, 2012; VAN DEN EINDEN *et al.*, 2012). A taxa de progressão da neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) para o câncer invasor chega a 30% em pacientes mais velhas (POLCHEIRA *et al.*, 2010).

A NIV diferenciada exibe o aspecto histológico de pápula verrucosa ou placa hiperqueratótica (SIDERI *et al.*, 2004). A NIV usual também conhecida como NIV clássica ou Bowenóide é subdivida em basalóide, verrucosa ou mista e todos os subtipos estão associados à infecção pelo *Papillomavirus humano* (HPV) (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; SIDERI *et al.*, 2004; HOEVENAARS *et al.*, 2008; VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009;

KOTSOPOULOS *et al.*, 2011; EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012). O CEC não queratinizante progride por meio da NIV usual e pode ser subdividido basalóide e verrucoso (Figura 3) (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; BROWN, 2013).

A classificação das lesões vulvares como NIV usual ou diferenciada foi estabelecida pela *International Society for the Study of Vulvar Disease* (ISSVD), em 2004 (SIDERI *et al.*, 2004). Antes disso, as alterações atípicas do tecido vulvar observadas por citologia eram classificadas como NIV 1, NIV 2 e NIV 3 ou carcinoma *in situ* (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2009), semelhante à classificação das neoplasias intraepiteliais do colo do útero (NIC). No entanto, as evidências indicam que NIV e NIC não possuem história natural semelhante e que o grau de NIV não representa o nível de progressão para doença maligna. Assim, em 2004, a ISSVD estabeleceu uma nova classificação histológica para doenças vulvares com apenas três divisões: NIV usual, NIV diferenciada e NIV não classificada, do tipo Pagetóide (SIDERI *et al.*, 2004). Os novos termos correspondiam à NIV 2 e 3 da antiga terminologia e o termo NIV 1 não era mais utilizado (DEMIRALAY *et al.*, 2012). Por isso, em 2010 a *American Registry of Pathology Fascicle 13* propôs a reutilização dos termos NIV 1, 2 e 3 e a subclassificação em verrucosa, basalóide, mista de verrucosa e basalóide, Pagetóide e diferenciada (simplex) (DARRAGH *et al.*, 2012). No presente trabalho foi utilizada a nomenclatura proposta pela ISSVD em 2004.

1.2 – Tumores De Vagina

A vagina é o canal que conecta o colo do útero ao ambiente externo. Pode ser dividida em terço superior, médio e inferior. O terço superior está anexado ao colo do útero. A parte anterior da vagina está intimamente ligada à bexiga e uretra e a parte posterior ao reto, compartilhando a parede do terço inferior com a uretra e o reto. O terço inferior da vagina está anexado à vulva pelo vestíbulo vulvar (Figura 4) (BAGGISH e KARRAM, 2010).

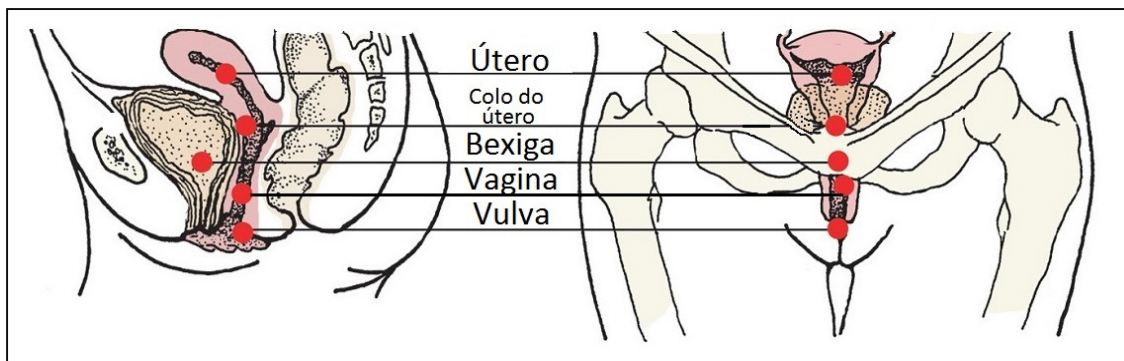


Figura 4 – Anatomia vaginal (adaptado de RUBIN e PHILIP, 2012)

Histologicamente, a vagina é recoberta por uma mucosa de epitélio escamoso não queratinizado, com múltiplas camadas. A vagina é altamente vascularizada, particularmente nas paredes lateral e anterolateral (BAGGISH e KARRAM, 2010).

Os tumores vaginais apresentam praticamente as mesmas divisões histológicas dos tumores vulvares: epiteliais (ANDERSEN *et al.*, 2003), mesenquimais (ÖSTÖR, 2003), mistos de epiteliais e mesenquimais (SILVERBERG, 2003), melanocíticos, neuroectodermis e linfóides (VANG, TAVASSOLI, e ANDERSEN, 2003). A maioria dos tumores malignos vaginais são os CEC (WU *et al.*, 2008), representando cerca de 80% dos casos (ANDERSEN *et al.*, 2003, SHAH *et al.*, 2009) e são subclassificados em queratinizantes, não queratinizantes, basalóides e verrucosos (FERREIRA *et al.*, 2008). A lesão precursora do CEC vaginal é a neoplasia intraepitelial vaginal (NIVa) (ANDERSEN *et al.*, 2003; DARRAGH *et al.*, 2012).

As NIVa foram recentemente reclassificadas pelo *College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*. LSIL (do inglês *low grade squamous intraepithelial lesion*) é o novo termo utilizado para doença de baixo grau correspondendo a NIVa1 e HSIL (do inglês *high grade squamous intraepithelial lesion*) para doença de alto grau correspondendo a NIVa2 e 3 (NELSON e STOCKDALE, 2013). No presente trabalho, as lesões intraepiteliais escamosas da vagina são referidas como NIVa.

1.3 –História Natural dos Tumores de Vulva e de Vagina

A carcinogênese vulvar evolui por meio de duas vias distintas, uma relacionada a distúrbios epiteliais não neoplásicos e a outra relacionada à infecção pelo HPV (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; HOEVENAARS *et al.*, 2008; VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009; ALONSO *et al.*, 2011; RUMBOLD *et al.*, 2012; VAN DEN EINDEN *et al.*, 2012).

Em mulheres mais velhas, predominantemente na fase pós menopausa, o câncer vulvar surge por meio de hiperplasia escamosa ou a partir do líquen escleroso (HOEVENAARS *et al.*, 2008, RUMBOLD *et al.*, 2012). Pacientes com líquen escleroso possuem um risco de 4 a 6% de desenvolver CEC vulvar (VAN DEN EINDEN *et al.*, 2012). A NIV diferenciada está associada à hiperplasia escamosa (SIDERI *et al.*, 2004, RUMBOLD *et al.*, 2012, DEMIRALAY *et al.*, 2012) e a 40% dos casos de líquen escleroso (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003). A NIV diferenciada é de difícil diagnóstico porque pode ser confundida com um epitélio normal. No entanto, essa lesão é altamente proliferativa e pode progredir rapidamente para um carcinoma invasivo (HOEVENAARS *et al.*, 2008). A NIV diferenciada é a precursora do CEC vulvar do tipo queratinizante (KOTSOPOULOS *et al.*, 2011; DEMIRALAY *et al.*, 2012). A presença do *Papillomavirus humano* (HPV) nessa lesão é rara, chegando a menos de 15% dos casos (KOTSOPOULOS *et al.*, 2011).

Mais de 70% dos tumores de vulva estão associados ao HPV (GROWDON e CARMEN, 2008; SUTTON *et al.*, 2008). A infecção do trato genital feminino pelo HPV é particularmente frequente em todo o mundo e a maioria é transitória. No entanto, as infecções persistentes causadas por HPV do tipo oncogênico são responsáveis pelo desenvolvimento do câncer (TSIMPLAKI *et al.*, 2012). A NIV usual está associada à infecção por HPV (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; SIDERI *et al.*, 2004; HOEVENAARS *et al.*, 2008; VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009; KOTSOPOULOS *et al.*, 2011; EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012) e progride para o CEC vulvar em cerca de 30% dos casos (SIDERI *et al.*, 2004; POLCHEIRA *et al.*, 2010). As lesões podem ser unifocais ou multifocais, com apresentação clínica em forma de manchas, erosões, placas, pápulas e nódulos (SIDERI *et al.*, 2004).

Poucos estudos de séries têm sido realizados sobre o câncer vaginal. Por isso, as informações sobre sua história natural, fatores prognósticos e tratamento são escassas (SHAH *et al.*, 2009). Em relação à progressão, há uma grande controvérsia sobre sua similaridade ao câncer vulvar ou ao cervical (FERREIRA *et al.*, 2008; GROWDON e CARMEN, 2008). Trabalhos mais recentes demonstram que o CEC vaginal se desenvolve por meio de múltiplas vias, a exemplo do câncer vulvar (ALONSO *et al.*, 2012), enquanto outros estudos anteriores defendem que a infecção pelo HPV seja o maior fator causal, como no câncer do colo do útero (WU *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2009). Nesse caso, a incidência de tumores vaginais seria menor porque a vagina não possui uma zona de transformação

celular como o colo do útero. Isso provavelmente implica em menor suscetibilidade da vagina à infecção pelo HPV (WU *et al.*, 2008). No entanto, existe o consenso de que a neoplasia intraepitelial vaginal (NIVa) é a precursora do CEC vaginal (ANDERSEN *et al.*, 2003; DARRAGH *et al.*, 2012).

A NIVa pode se desenvolver na vagina ou como extensão de uma lesão do colo do útero ou da vulva (ANDERSEN *et al.*, 2003). Assim, para que um tumor vaginal seja considerado primário e não uma recidiva, é necessário um intervalo de no mínimo cinco anos livres de doença em pacientes que foram tratadas por carcinomas vulvares ou cervicais anteriormente (ANDERSEN *et al.*, 2003; BROWN, 2013).

1.4 – Etiologia dos Tumores de Vulva e de Vagina

A NIV usual e os CEC vulvares relacionados ao HPV, possuem praticamente os mesmos fatores etiológicos do carcinoma cervical (DEL PINO *et al.*, 2013). Assim, o tabagismo (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; HAMPL *et al.*, 2006; HOEVENAARS *et al.*, 2008; SUTTON *et al.*, 2008; RUMBOLD *et al.*, 2012), a imunossupressão, a prática sexual com múltiplos parceiros (JONES, ROWAN e STEWART, 2005; HAMPL *et al.*, 2006; DEL PINO *et al.*, 2013), além de história de lesões cervicais ou vulvares (JONES, ROWAN E STEWART *et al.*, 2005; HAMPL *et al.*, 2006) e irradiação pélvica (JONES, ROWAN E STEWART *et al.*, 2005) são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CEC vulvar em mulheres mais jovens (DEL PINO *et al.*, 2013). Em contraste, a NIV diferenciada e, conseqüentemente o CEC queratinizante, são mais comuns em pacientes idosas e ocorrem frequentemente em mulheres com doenças dermatológicas crônicas, como líquen escleroso (DEL PINO *et al.*, 2013). A etiologia do CEC vulvar pode ainda ser atribuída à interação do HPV com fatores genéticos relacionados à etnia (HAMPL *et al.*, 2006; GROWDON e CARMEN, 2008; RUMBOLD *et al.*, 2012). A maior incidência de câncer de vulva em mulheres com menos de 50 anos é descrita no norte da Austrália, onde vivem tribos indígenas (2,3 por 100mil). Um Estudo com mais de 500 mulheres indígenas de Arhem Land, Austrália, demonstrou uma alta prevalência de HPV entre essas mulheres com uma maior proporção de infecção pelo HPV na vulva que no colo do útero (RUMBOLD *et al.*, 2012).

Os fatores etiológicos do CEC vaginal incluem idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais e infecção pelo HPV (WU *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2009;

INSINGA *et al.*, 2009), principalmente o HPV16. Há evidências limitadas de que o vírus da imunodeficiência humana (HIV) esteja associado ao CEC vaginal (WEIDERPASS e LABRÈCHE, 2012). História de doença pré-maligna ou maligna do baixo trato genital e irradiação pélvica também têm sido relatadas como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer vaginal (ANDERSEN *et al.*, 2003; WEIDERPASS e LABRÈCHE, 2012). Cerca de 30% dos CEC vaginais surgem em mulheres tratadas anteriormente por câncer do colo do útero (ALONSO *et al.*, 2012).

1.5 – Epidemiologia dos Tumores de Vulva e de Vagina

O câncer vulvar ocorre predominantemente em mulheres na fase pós menopausa, em média, aos 69 anos. No entanto, tem havido um aumento na incidência de mulheres com câncer de vulva com menos de 50 anos (HAMPL *et al.*, 2006; GROWDON e CARMEN, 2008; WOELBER *et al.*, 2009; BAUMANN *et al.*, 2010; OLSEN *et al.*, 2012; RUMBOLD *et al.*, 2012). Os tumores relacionados ao HPV que evoluem por meio de NIV usual, são geralmente diagnosticados em mulheres com mais de 30 anos ou imunocomprometidas (SIDERI *et al.*, 2004; KOTSOPOULOS *et al.*, 2011). Os tumores vulvares que não estão relacionados ao HPV são mais frequentes em mulheres mais idosas (HAMPL *et al.*, 2006).

O potencial invasivo da NIV usual é de 9% em pacientes não tratadas, com um período de progressão para câncer invasivo de 1 a 8 anos e 3,3% de progressão em pacientes tratadas (BRUCHIM *et al.*, 2007; NELSON e STOCKDALE, 2013). A taxa de sobrevivência em cinco anos varia de 28 a 29%, dependendo do estágio da doença (SUTTON *et al.*, 2008).

A taxa ajustada à idade de incidência de câncer vulvar no mundo varia entre 0,5 e 1,5 por 100 mil mulheres, sem um padrão geográfico claro (SHUKLA *et al.*, 2009; WEIDERPASS e LABRÈCHE, 2012). No entanto, alguns estudos demonstram que as altas taxas de incidência desses tumores são observadas em países europeus, como Escócia, Dinamarca, Espanha e Itália, enquanto a África, o Sul da Ásia e a América Latina apresentam baixa incidência (PARKIN e BRAY, 2006; SHUKLA *et al.*, 2009).

Na Alemanha, a incidência de câncer invasivo vulvar é de aproximadamente 2,5 por 100 mil mulheres por ano, similar à taxa ajustada à idade na Inglaterra (BAUMANN *et al.*, 2010). Entre 2004 e 2007, foram detectados 389 casos de câncer de vulva na Dinamarca (OLSEN *et al.*, 2012). Cerca de 189 novos casos de câncer de vulva são detectados

anualmente na República Tcheca (TACHEZY *et al.*, 2011). Foram estimados cerca de 3.740 novos casos de câncer vulvar nos Estados Unidos, em 2005, com 880 mortes (HAMPL *et al.*, 2006), 3.490 em 2007, com 880 mortes (INSINGA *et al.*, 2009), 3.242 em 2009 (JEMAL *et al.*, 2013) e 3.900 casos com 920 óbitos em 2010 (GROWDON e CARMEN, 2008; INSINGA *et al.*, 2009).

O carcinoma vaginal representa um pequeno grupo entre as doenças malignas que afetam o sistema reprodutor feminino, chegando a cerca de 2% desses casos (LARSSON *et al.*, 2013). É uma doença que acomete principalmente mulheres idosas, com cerca de 50% dos casos detectados em mulheres com mais de 70 anos. Segundo o registro do programa americano *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), a idade mais prevalente das mulheres ao diagnóstico do câncer vaginal, no período entre 1990 e 2004 foi de 65,7 anos. No grupo etário com idade entre 80 e 89 anos, a incidência foi maior durante esse período: 4,43 por 100 mil mulheres. Já entre o grupo de 20 a 29 anos, a incidência declinou para 0,03 por 100 mil mulheres. A sobrevida dessas mulheres em cinco anos foi de 84%, quando diagnosticadas com o estágio I da doença, 75% com estágio II e 57% nas que apresentavam estágio avançado da doença (SHAH *et al.*, 2009).

O câncer de vagina possui um padrão de distribuição geográfica similar ao do câncer cervical (SHUKLA *et al.*, 2009). A incidência de câncer vaginal é estimada entre 0,3 e 0,7 por 100 mil mulheres na maioria dos países (WEIDERPASS e LABRÈCHE, 2012). Entre 2004 e 2007 foram detectados 92 casos de câncer de vagina na Dinamarca (OLSEN *et al.*, 2012). Em 2009, 734 novos casos de câncer de vagina foram registrados nos Estados Unidos (JEMAL *et al.*, 2013), sendo que, anualmente, são detectados 1.100 novos casos e 400 mortes por câncer vaginal nesse país (GROWDON e CARMEN, 2008; INSINGA *et al.*, 2009).

No mundo todo, a média de novos casos de câncer de vulva e de vagina é de 25.600 por ano (TACHEZY *et al.*, 2011). No Brasil a incidência do câncer de vulva entre 1993 e 1997 era de 1,5 por 100mil mulheres e do câncer vaginal era de 1,4 por 100 mil mulheres (PARKIN e BRAY, 2006). Em Goiânia, o Registro de Câncer de Base Populacional registrou 96 casos de câncer de vulva e 57 de câncer de vagina entre 1996 e 2005 (REGISTRO DE CÂNCER DE BASE POPULACIONAL DE GOIÂNIA, 2003; GROWDON e CARMEN, 2008). No entanto, não existem informações sobre incidência anual ou estimativas de casos de câncer de vulva e de vagina no Brasil (POLCHEIRA *et al.*, 2010).

1.6 – HPV e a Carcinogênese

Estima-se que mais de 50% das pessoas sexualmente ativas são infectadas pelo *Papillomavirus humano* (HPV) em algum momento da vida (NELSON e STOCKDALE, 2013). O HPV é um pequeno vírus de DNA (ácido desoxirribonucleico) circular de dupla fita, integrante da família *Papillomaviridae* (DE PAULA, 2011; EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2013). O genoma do HPV é composto por cerca de 8000 pares de bases (pb) e dividido em três regiões principais: a precoce ou E (do inglês *Early*), a tardia ou L (do inglês *Late*) e a região regulatória ou LCR (do inglês *Long Control Region*) (MUÑOZ *et al.*, 2006; DE PAULA 2011). A região precoce codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Elas são necessárias para a replicação do DNA viral e para a montagem de partículas virais recém produzidas dentro das células infectadas (MUÑOZ *et al.*, 2006). Um *splicing* alternativo do mRNA do HPV dentro da célula do hospedeiro origina o transcrito de fusão E8^{E2C}, que controla a replicação viral (ZOBEL, IFTNER e STUBENRAUCH, 2003). A região tardia codifica as proteínas do capsídeo L1 e L2 (MUÑOZ *et al.*, 2006; DE PAULA 2011). Entre as duas regiões do cromossomo viral, está a LCR com cerca de 1000 pb. Essa região não codifica proteínas e contém elementos *cis* que são necessários para a regulação da expressão e replicação genética viral (figura 5) (MUÑOZ *et al.*, 2006).

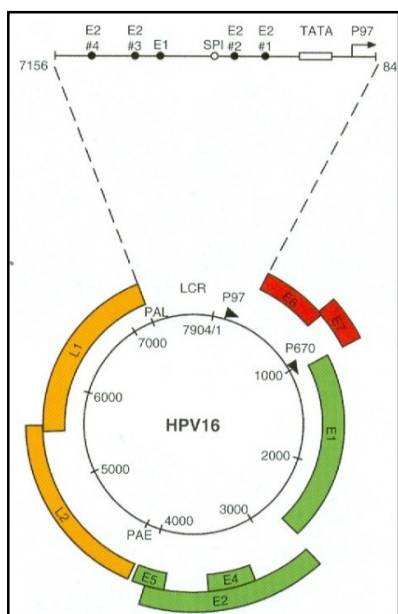


Figura 5 - Genoma do HPV (adaptado de OPARKA e HERRINGTON, 2013).

O HPV é classificado em 16 gêneros nomeados com as letras do alfabeto grego. Os HPVs que infectam humanos foram

distribuídos em cinco gêneros: Alpha, Beta, Gama, Mu e Nu (VILLIERS *et al.*, 2004; FRAZER *et al.*, 2006; BERNARD *et al.*, 2010). O HPV possui epiteliotropismo mucoso ou cutâneo (EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2013). Os HPVs que infectam a mucosa humana estão no gênero dos *alphapapillomavirus*, e os cutâneos entre os *betapapillomavirus* (EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012). Baseado na relação filogenética e sua presença em tumores do colo do útero benignos ou malignos, os HPVs foram divididos ainda em baixo risco e alto risco oncogênico (VAN RANST *et al.*, 1992). Os *alphapapillomavirus* mucosos contêm genótipos de HPV de alto risco, como os HPV16 e 18, que são os mais frequentemente associados ao câncer humano (EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2013). Os *betapapillomavirus* são ubíquos na pele e folículos pilosos (EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012).

O HPV16 é o genótipo mais frequente nos carcinomas vulvares e vaginais (KOYAMATSU *et al.*, 2003; HAMPL *et al.*, 2008; SUTTON *et al.*, 2008; INSINGA *et al.*, 2008; DE VUYST *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008; TSIMPLAKI *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2012; LARSSON *et al.*, 2013). O sequenciamento de um pequeno intervalo do gene E6 do HPV16 demonstrou que existem cinco diferentes subtipos com variantes de cada tipo. As variantes do HPV16 podem diferir na habilidade de induzir persistência viral e subsequente desenvolvimento de câncer (LARSSON *et al.*, 2007).

O HPV explora a maquinaria celular do hospedeiro para se replicar. O ciclo se inicia quando as partículas virais alcançam a camada basal do epitélio, onde podem infectar as células tronco, que são altamente proliferativas. Quando essas células são empurradas para a camada suprabasal, elas perdem a capacidade de se dividir e começam a se diferenciar. O HPV é liberado para o meio ambiente por meio da desintegração das células epiteliais nas camadas superficiais (MUÑOZ *et al.*, 2006) (Figura 6).

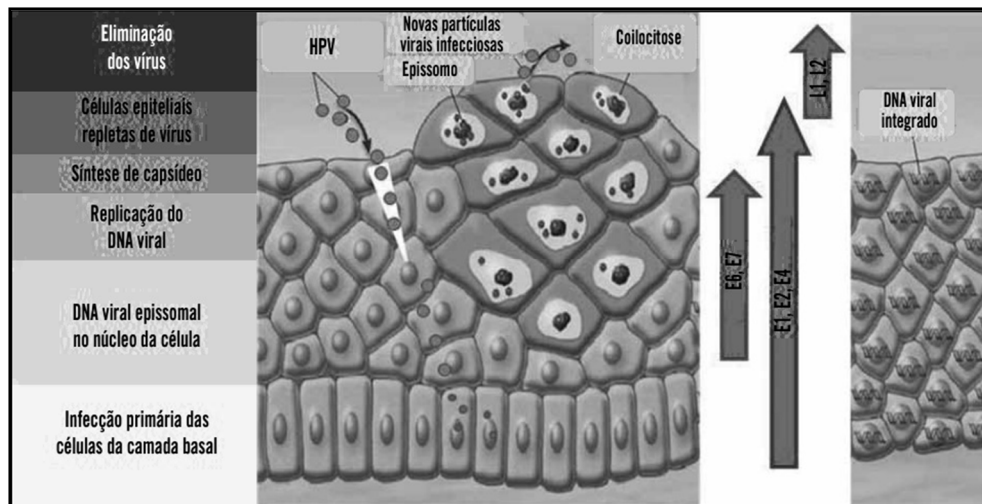


Figura 6 – Infecção e proliferação do HPV nas células epiteliais (FERRARO *et al.*, 2011).

O cromossomo viral é normalmente mantido em forma de plasmídeo nas células basais do epitélio, mas pode ocorrer a integração de um fragmento ao cromossomo do hospedeiro, rompendo o controle normal da expressão gênica viral. A expressão desregulada das proteínas virais interfere com o controle da divisão celular nas células basais, iniciando a progressão para o câncer (Figura 7) (NGUYEN, RAMIREZ-FORT E RADY, 2014).

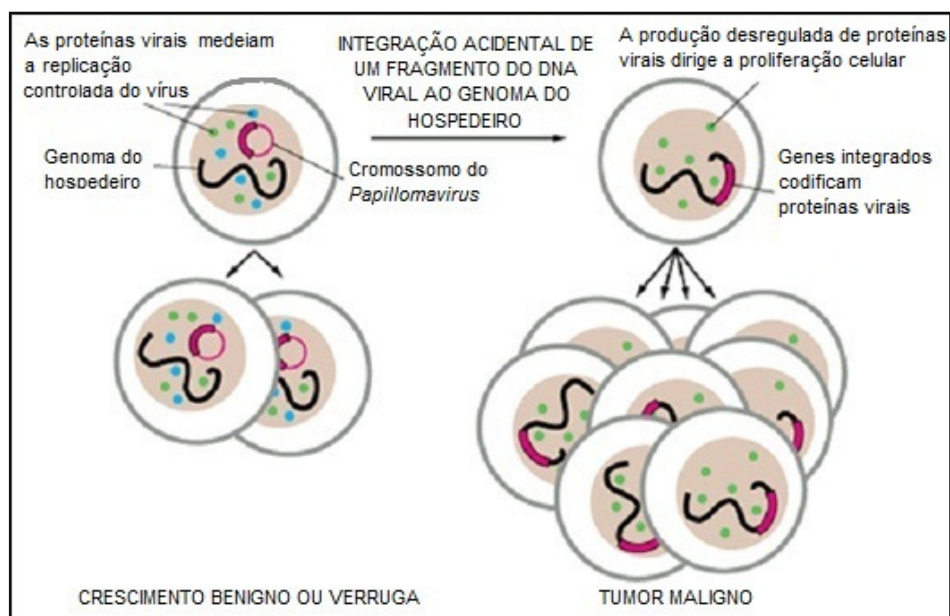


Figura 7 - Integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro (adaptado de ALBERTS *et al.*, 2008).

A integração do DNA ao genoma do hospedeiro parece estar relacionada com a progressão da neoplasia vulvar (VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009). A proteína viral E2 junto com a helicase E1 regulam a transcrição e a replicação do DNA viral (JACOBELLI *et al.*, 2012). A integração viral geralmente rompe a região E2, resultando em aumento da expressão de E6 e E7 (VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009; EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012). Os produtos dos genes E6 e E7 desempenham papéis cruciais na carcinogênese por inativarem a proteína supressora de tumor p53 e a proteína do retinoblastoma pRb, respectivamente (NIEBLER *et al.*, 2013). A proteína viral E6 se liga à ubiquitina ligase, formando o complexo E6AP e p53, resultando em ubiquitinação de p53 e sua subsequente degradação proteolítica. A proteína E7, por outro lado, promove a progressão do ciclo celular pela desestabilização do complexo pRb-E2F (VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2013). Com a pRb inativada por E7, o fator de transcrição E2F desencadeia a expressão das proteínas necessárias à replicação do DNA (MUÑOZ *et al.*, 2006). Isso promove a rápida progressão do ciclo celular sem o controle de integridade mediado por p53 (figura 8) (VAN DE NIEUWENHOF *et al.*, 2009) e o retardo da diferenciação das células epiteliais (MUÑOZ *et al.*, 2006).

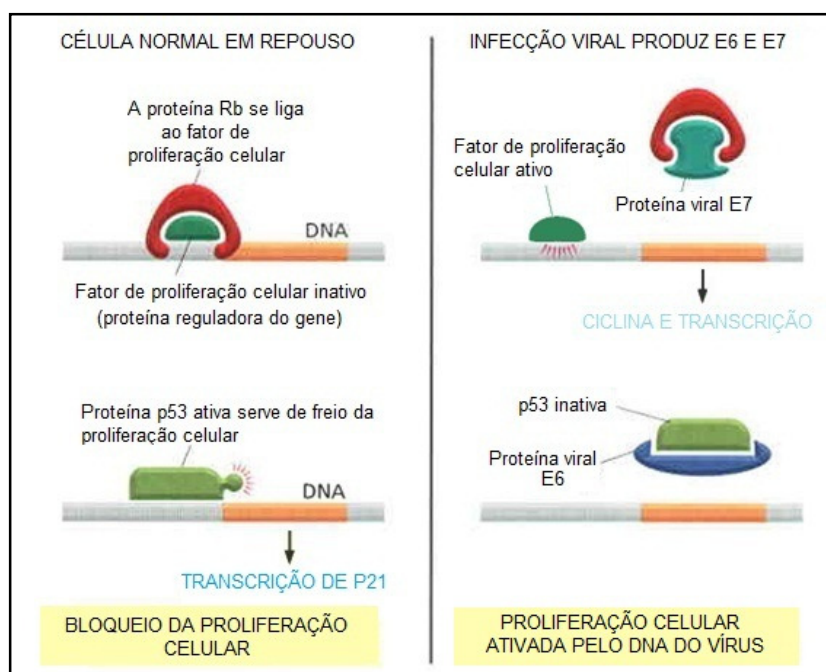


Figura 8 - Ativação da proliferação celular desencadeada por proteínas do HPV (adaptado de ALBERTS *et al.*, 2008).

A natureza da infecção pelo HPV em NIV permanece menos definida que em NIC, assim como o mecanismo pelo qual o HPV contribui para o risco de progressão de NIV para CEC invasivo da vulva. (EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012).

1.7 – Genética dos Tumores de Vulva e de Vagina

A maioria das mutações ou alterações epigenéticas encontradas nos tumores de vulva estão relacionadas com as vias de proliferação celular e da apoptose. Nas fases iniciais da infecção pelo HPV, a inibição da apoptose é essencial para que o vírus possa sobreviver e manter o seu genoma. No entanto, nas fases posteriores da infecção, a apoptose ajuda os vírions a escaparem das células epiteliais (OPARKA e HERRINGTON, 2013). O papel do HPV no desenvolvimento e progressão do câncer é amplamente dependente da função carcinogênica de suas proteínas E6 e E7 (KLEMBBA *et al.*, 2011). Elas interagem com as proteínas responsáveis pela apoptose ou pela progressão do ciclo celular (KLEMBBA *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2013). As vias mais interrompidas por E6 e E7 são aquelas reguladas por p53 e pRb. Além disso, essas proteínas também interferem no sistema imune, criando um microambiente mais adequado à sobrevivência e reprodução viral (NIEBLER *et al.*, 2013).

A proteína p53 é uma supressora de tumor que detecta alterações no DNA na fase G1, resultando na parada do ciclo celular ou em apoptose (HOEVENAARS *et al.*, 2008). Um dos alvos de p53 é a proteína p21/WAF, conhecida como inibidor 1 de quinase dependente de ciclina (CDK) ou proteína de interação CDK 1. A proteína p21/WAF bloqueia a replicação do DNA, impedindo a progressão do ciclo celular. Assim, a degradação ou a mutação de p53 resulta na falha dessa parada, predispondo a célula a acumular danos no DNA e a desenvolver um fenótipo transformado (KLEMBBA *et al.*, 2011; WELLENHOFER e BRUSTMANN, 2012). Em tumores relacionados ao HPV, p53 é degradada por intermédio da proteína viral E6 (OPARKA e HERRINGTON, 2013). O acúmulo de proteínas mutadas é detectado nos tumores HPV negativos (HOEVENAARS *et al.*, 2008). A superexpressão de p53 tem sido sugerida como um evento tardio no desenvolvimento do CEC vulvar, coincidindo com metástase linfonodal (KLEMBBA *et al.*, 2011).

A proteína 14-3-3 sigma também está envolvida em uma das vias bioquímicas de p53. Ela estabiliza a expressão de p53 e potencializa sua atividade transcricional. Além

disso, 14-3-3 sigma possui a capacidade de se ligar à CDK e sequestrar o complexo B1-CD2, paralisando o ciclo celular em G2/M. A metilação de 14-3-3 sigma tem sido detectada tanto nas lesões vulvares de alto grau quanto no CEC vulvar, independente do estado do HPV e da expressão de TP53. Em NIV1 ou tecidos saudáveis, não ocorre a metilação de 14-3-3, sugerindo que essa alteração epigenética seja um evento inicial da carcinogênese vulvar. Em CEC vulvar e NIV3, a metilação do gene 14-3-3 sigma está frequentemente acompanhada pela inativação de p16^{INK4a} (KLEMBA *et al.*, 2011).

A proteína p16^{INK4a} desempenha papéis importantes nas vias de RB e TP53. A proteína viral E7 inativa Rb, que libera E2F, que por sua vez ativa a superexpressão de p16^{INK4a} em tumores associados ao HPV. Em contrapartida, a metilação de p16^{INK4a} é detectada tanto em NIV quanto em CEC vulvar não associados ao HPV. Nesse caso, a pRb é expressa e a p16^{INK4a} é silenciada (KLEMBA *et al.*, 2011).

A proteína Rb é um membro da via pRb (pRb-ciclina D1-p16^{INK4a}-cdk4/6). O silenciamento de alguma proteína da família pRb é um evento frequente no CEC vulvar. A baixa expressão de pRb está associada a uma pobre diferenciação do tumor. Quando E7 se liga a pRb, impede a formação do complexo pRb/E2F, levando à progressão do ciclo celular da fase G1 para S.

As proteínas virais E6 e E7 induzem ainda a expressão de fatores de transcrição TEM (Transição epitelial-mesenquimal), que resultam em supressão da E-caderina no tecido epitelial e superexpressão de N-caderina, fibronectina e vimentina do tecido mesenquimal. A supressão dessas proteínas pode induzir o desprendimento das células tumorais e causar metástases (JUNG *et al.*, 2013).

A proteína E2 do HPV também desempenha um papel importante no ciclo de vida do vírus. Essa proteína inibe AKT1 para enfraquecer a camada córnea e permitir a reinfeção pelo HPV. A proteína AKT1 também inibe a apoptose e sua desregulação desempenha um papel significativo em muitos tumores (EKEOWA-ANDERSON *et al.*, 2011; de MELO MAIA *et al.*, 2011).

A proteína hTERT pode cooperar com o silenciamento de pRb na immortalização dos queratinócitos (OPARKA e HERRINGTON, 2013). A proteína hTERT corresponde a um dos domínios da telomerase que possui a função de transcriptase reversa (LIU *et al.*, 2009; OPARKA e HERRINGTON, 2013). Quando a telomerase está ativa, as células são capazes de superar a senescência replicativa e se dividir indefinidamente (WELLENHOFER e

BRUSTMANN, 2012). A proteína E6 interage com hTERT e imortaliza os queratinócitos com o auxílio da E7 (LIU *et al.*, 2009). A telomerase está frequentemente ativa em muitos tipos de linhagens celulares cancerígenas, mas não na maioria dos tecidos saudáveis (WELLENHOFER e BRUSTMANN, 2012).

Uma relação entre hTERT e survivina é observada. Ambas são superexpressas em vários tumores e o silenciamento de uma inibe a expressão da outra. A via que envolve essas duas proteínas ainda é desconhecida, mas foi sugerido que a interação ocorre entre a survivina e a proteína de especificidade 1 (Sp1) e c-Myc. Nesse caso, a survivina funcionaria como fator de transcrição desses genes, que por sua vez, funcionariam como fatores de transcrição de hTERT (WELLENHOFER e BRUSTMANN, 2012).

A survivina é frequentemente superexpressa em tumores e indica um pior prognóstico no que diz respeito a metástases. A survivina está relacionada com a angiogênese e a quimiorresistência. Ela impede as paradas do ciclo celular, mantendo a viabilidade de células aneuplóides. A survivina também é considerada alvo de terapia gênica. O silenciamento da survivina é capaz de suprimir tumores em humanos, segundo evidências experimentais. A survivina inibe a apoptose por mecanismos capase-dependentes e independentes. (WELLENHOFER e BRUSTMANN, 2012).

As caspases são uma família de enzimas envolvidas em muitas vias importantes para a infecção pelo HPV. A caspase 3 é responsável pela clivagem da pRb (PORTER e JÄNICKE *et al.*, 1999). A caspase 1 converte pró-interleucina 1 β em interleucina 1 β (IL-1 β), responsável pela resposta imune contra infecções virais e bacterianas. Ela media a migração de leucócitos, induz febre e promove a ativação e polarização das células T. A ausência ou expressão anormal de IL-1 β altera as condições do microambiente patológico, resultando em inflamação crônica ou em ausência da vigilância imune contra infecções. A ubiquitina ligase E3E6AP e p53 controlam também a degradação proteossômica de pró-interleucina 1 β (NIEBLER *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do CEC de vulva é mais frequente em pacientes imunocomprometidas. Isso confirma que as disfunções imunológicas podem ser consideradas como um fator na transformação neoplásica vulvar (KLEMBBA *et al.*, 2011).

Poucos estudos avaliaram a citogenética do câncer vulvar e existe uma alta discordância sobre as anormalidades cromossômicas. No entanto, os cromossomos 3 e 8 parecem ser os mais afetados (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003, KLEMBBA *et al.*, 2011). A

amplificação de 3q foi relatada tanto em CEC vulvar quanto em líquen escleroso, sugerindo que esse seja um evento precoce na progressão do CEC vulvar (KLEMBA *et al.*, 2011). Existe uma correlação inversa entre diferenciação histológica e complexidade cariotípica. A perda de 10q e 18q parece estar associada com um pior diagnóstico em CEC (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003).

Os trabalhos sobre a genética do câncer vaginal são geralmente antigos e a maioria trata apenas da associação do adenocarcinoma de células claras ao uso do dietilestilbestrol durante a vida intrauterina das pacientes (MELNICK *et al.*, 1987; BOYD *et al.*, 1996; HATCH *et al.*, 2001).

1.8 – Fatores Prognósticos dos Tumores de Vulva e de Vagina

A maioria dos fatores prognósticos dos tumores de vulva e de vagina, a exemplo dos tumores em geral, coincidem com os parâmetros TNM (T= tumor primário; N= Linfonodo regional; M= Metástase à distância) (BROWN, 2013). O Sistema TNM para a classificação dos tumores malignos foi desenvolvido entre 1943 e 1952 na França. Em 1982 os comitês nacionais do TNM concordaram em formular um único TNM. Em 1995, os Fatores Prognósticos do Câncer foram publicados (EISENBERG, 2004).

A divisão dos casos em estádios foi feita de acordo com as taxas de sobrevida. A sobrevida é maior nos casos em que a doença é localizada do que quando a doença se estende além do local de origem. Os estádios do TNM se baseiam na classificação clínica e/ou patológica, enquanto os estádios da *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) se baseiam no estadiamento cirúrgico (EISENBERG, 2004). A correlação entre o estadiamento TNM e FIGO dos tumores de vulva e de vagina pode ser observada nas tabelas I e II, respectivamente.

Tabela I: Estadiamento TNM e FIGO dos tumores de vulva:

TNM	Tumores de vulva	FIGO
T	Tumor Primário	
Tx	O tumor primário não pôde ser determinado	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (preinvasivo)	
T1	Tumor confinado à vulva ou vulva e períneo, com 2cm ou menos em sua maior extensão.	I
T1a	Tumor confinado à vulva ou vulva e períneo, com 2cm ou menos em sua maior extensão e com invasão estromal até 1mm.	IA
T1b	Tumor confinado à vulva ou vulva e períneo, com 2cm ou menos em sua maior extensão e com invasão estromal maior que 1mm.	IB
T2	Tumor confinado à vulva ou vulva e períneo, com mais de 2cm em sua maior extensão	II
T3	Tumor invadindo a parte inferior da uretra, vagina ou ânus.	III
T4	Tumor invadindo mucosa vesical, retal, parte superior da uretra ou fixo ao osso púbico.	IVA
N	Linfonodo regional	
Nx	O linfonodo regional não pode ser avaliado	
N0	Sem metástase linfonodal regional	
N1	Metástase linfonodal unilateral regional	III
N2	Metástase linfonodal bilateral regional	IVA
M	Metástase à distância	
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada	
M0	Sem metástase à distância	
M1	Metástase à distância (incluindo linfonodos pélvicos)	IVB

Fonte: adaptado de EISENBERG, 2004; HAN e KOHN, 2012.

Tabela II: Estadiamento TNM e FIGO dos tumores de vagina:

TNM	Tumores de vagina	FIGO
T	Tumor Primário	
Tx	O tumor primário não pôde ser determinado	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (preinvasivo)	0
T1	Tumor confinado à vagina	I
T2	Tumor invadindo tecidos paravaginais mas não se estendendo pela parede pélvica	II
T3	Tumor se estende pela parede pélvica	III
T4	Tumor invade mucosa da bexiga ou do reto e/ou se estende pela pélvis verdadeira	IVA
N	Linfonodo regional	
Nx	O linfonodo regional não pode ser avaliado	
N0	Sem metástase linfonodal regional	
N1	Metástase para linfonodo regional	
M	Metástase à distância	
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada	
M0	Sem metástase à distância	
M1	Metástase à distância	IVB

Fonte: adaptado de EISENBERG, 2004; HAN e KOHN, 2012.

A recorrência tumoral é diretamente proporcional ao estágio do tumor. O risco de recorrência de tumores vulvares no estágio IA é muito baixo, com 5 a 10 anos livres de recorrência e sobrevivência de 100 e 94,7%, respectivamente (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003). A informação sobre o padrão de recorrência do câncer vulvar ainda é muito limitada. A maioria das recorrências está confinada à região vulvar (WOELBER *et al.*, 2009). A recorrência de um segundo carcinoma em outro local próximo à vulva é rara, mas fatal na maioria das vezes (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; WOELBER *et al.*, 2009). As recorrências inguinais estão correlacionadas ao estágio avançado do tumor e ao envolvimento linfonodal inicial (WOELBER *et al.*, 2009).

A avaliação linfonodal é o fator prognóstico mais utilizado durante o tratamento dos tumores de vulva (KOWALEWSKA *et al.*, 2012). A sobrevivência em 10 anos é de 76 a 90% das pacientes que não tiveram os linfonodos afetados pela doença e de 32 a 39,5% das pacientes com linfonodos comprometidos (BROWN, 2013). O exame clínico nem sempre é suficiente para avaliar corretamente o comprometimento linfonodal. O número de diagnósticos clínicos que diagnostica linfonodos comprometidos como livres de comprometimento supera os 24%, enquanto mais de 20% das pacientes recebem o diagnóstico incorreto de linfonodos comprometidos (KOWALEWSKA *et al.*, 2012). O dissecamento de linfonodos inguinais nem sempre é aconselhado devido o histórico de alta morbidade (BROWN, 2013).

Além dos parâmetros clínicos indicados pelo TNM e pela FIGO, a margem cirúrgica e a idade são utilizadas como prognósticos para as pacientes com CEC vulvar (WOELBER *et al.*, 2009). O envolvimento do espaço vascular influencia a incidência de metástase (BROWN, 2013).

Uma pobre diferenciação celular também pode influenciar na progressão do câncer vulvar em alguns casos, sugerindo um pior prognóstico (BROWN, 2013). A proteína c-KIT está envolvida no processo de diferenciação celular. Pesquisas têm demonstrado que os tumores vulvares que expressam c-KIT apresentam melhor prognóstico (MELO MAIA, 2011).

O risco de metástase e morte devido ao CEC de vulva é de longe maior que o de CEC em qualquer outro local da pele (BROWN, 2013). Os tumores de vagina podem

eventualmente metastatizar para locais como pulmões, fígado e cérebro (ANDERSEN *et al.*, 2003).

O estágio clínico, o tamanho do tumor, a histologia e a modalidade de tratamento afetam o risco de mortalidade de mulheres com câncer vaginal. A localização do tumor, o grau de queratinização ou a idade da paciente não demonstram valor prognóstico (ANDERSEN *et al.*, 2003).

O fator prognóstico mais significativo do câncer vaginal é o estadiamento (ANDERSEN *et al.*, 2003). As taxas de controle local, metástase à distância e sobrevivência das pacientes com CEC vaginal estão fortemente relacionadas com o estadiamento FIGO (HACKER, EIFEL e VAN DER VELDEN, 2012). A sobrevivência das pacientes em cinco anos é de 70% em estágio I, 45% em estágio II, 30% em estágio III e 15% em estágio IV. A sobrevida global em 5 anos é de cerca de 42% (ANDERSEN *et al.*, 2003).

O tamanho do tumor também é um importante preditor de sobrevida (HACKER, EIFEL e VAN DER VELDEN, 2012). Tumores maiores que 4 cm estão relacionados a um pior prognóstico (HACKER, EIFEL e VAN DER VELDEN; 2012; BROWN, 2013). Tumores exofíticos parecem estar associados a um pior prognóstico que as lesões infiltrantes ou necróticas (HACKER, EIFEL e VAN DER VELDEN, 2012).

As recorrências dos tumores vaginais são geralmente locais e ocorrem dentro de dois anos de tratamento (ANDERSEN *et al.*, 2003).

Existe controvérsia a respeito da presença ou ausência do HPV como fator prognóstico para o câncer vaginal. Mulheres com câncer de vagina estágio I ou II, HPV positivas parecem ter um melhor prognóstico que mulheres com tumores HPV negativos em estágios iniciais (ALONSO *et al.*, 2012).

1.9 – Tratamento dos Tumores de Vulva e de Vagina

O tratamento clássico do CEC de vulva é a remoção da maior parte da vulva (GAUDINEAU *et al.*, 2012; BROWN, 2013). A vulvectomy é uma cirurgia drástica que leva à morbidade local significativa com riscos de infecção da ferida, linfedema das pernas, linfocisto, tromboembolia e aumento do período de internação hospitalar (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011; BROWN, 2013). A morte perioperatória ocorre em 2 a 5% dos casos (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). As técnicas cirúrgicas modernas procuram diminuir a morbidade das pacientes com câncer de vulva por meio da redução da extensão cirúrgica.

De acordo com o tamanho do tumor, o procedimento adotado pode ser uma vulvectomy simples, uma hemivulvectomy ou uma excisão local ampliada (BROWN, 2013). Durante a excisão, é retirada uma margem de tecido saudável de 1 cm, a menos que isso comprometa o ânus e ou a uretra (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011).

Quando o tumor é detectado em estágio IA ou superior, a linfadenectomia inguinal é aconselhada (Figura 9) (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003). Se os linfonodos superficiais estiverem comprometidos, pode ser necessária a aplicação de quimioterapia ou radioterapia na região desses linfonodos (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003). A maioria das complicações agudas e sub-agudas da vulvectomy radical está relacionada com a linfadenectomia (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). Os riscos são atenuados com a remoção dos linfonodos inguinais em incisões separadas da vulvectomy (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011; BROWN, 2013). As linfadenectomias unilaterais também podem ser empregadas se o tumor estiver bem localizado em apenas um lado da vulva. A linfadenectomia unilateral leva a um aumento nas recorrências locais, mas sem redução de sobrevida (BROWN, 2013).

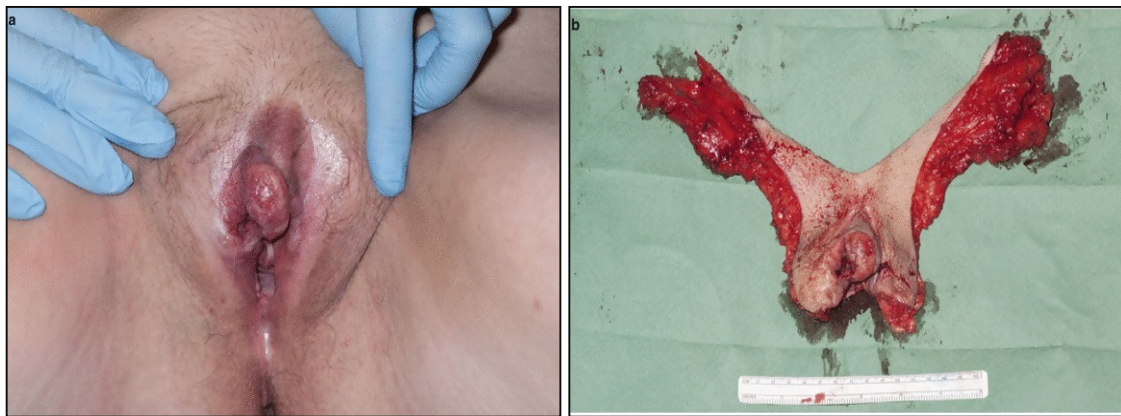


Figura 9 – A: CEC vulvar nos lábios direitos, avançando para clitóris. **B:** Vulvectomy com linfadenectomia inguinal bilateral (BROWN, 2013).

Pacientes com tumores que invadem a camada tissular adjacente em mais de 1 mm são tratadas também com radioterapia (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). Estudos com pacientes que receberam radioterapia neoadjuvante devido a lesões que exigiriam uma exenteração pélvica demonstram que a radioterapia pode ser utilizada para reduzir a extensão da cirurgia ou erradicar a doença (GAUDINEAU *et al.*, 2012). Muitos

pesquisadores exploram a combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia em pacientes com CEC vulvar avançado localmente (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). A radioterapia concomitante com a quimioterapia utilizando 5-fluoracil (5-FU) propicia a regressão de vários CEC no ânus, esôfago, cabeça, pescoço e colo do útero (GAUDINEAU *et al.*, 2012). A combinação de cisplatina, 5-FU e mitomicina-C, demonstra bons resultados no tratamento de carcinomas do colo do útero e de cabeça, além de funcionarem como rediossensibilizantes no tratamento dos carcinomas anais. A complicação aguda mais relevante da radioterapia para CEC vulvar é a dermatite (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011).

As técnicas de tratamento do câncer vaginal variam de acordo com o local, o tamanho e a distribuição da lesão na vagina e estruturas adjacentes (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). A radioterapia é geralmente o tratamento mais utilizado para o estágio I do câncer vaginal (ANDERSEN *et al.*, 2003; EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). A radiação é aplicada de forma intracavitária, por meio de implantes intersticiais ou na região externa pélvica e inguinal, geralmente em combinação (ANDERSEN *et al.*, 2003). Quando o tumor acomete o terço médio ou inferior da vagina, os campos de radiação externa incluem os linfonodos femorais (ANDERSEN *et al.*, 2003).

Pacientes em estágio II geralmente são tratadas com radiação externa aplicada em toda a pélvis. A braquiterapia é utilizada como dose suplementar no local primário do tumor vaginal em muitos casos (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). A quimioterapia com cisplatina concomitante à radioterapia é aplicada pelos oncologistas no câncer vaginal desde o final dos anos 90. A adoção da radioquimioterapia como tratamento para os tumores vaginais concedeu às pacientes uma vantagem de sobrevivência (SHAH *et al.*, 2009).

A proximidade anatômica da vagina com a bexiga e o reto torna esses órgãos vulneráveis ao tratamento com radioterapia. Assim, o câncer vaginal também pode ser tratado por cirurgia (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). Quando o câncer está no estágio I e a doença é localizada na parte superior da vagina, o tratamento cirúrgico pode ser uma histerectomia radical com linfadenectomia pélvica ou uma vaginectomia parcial (SHAH *et al.*, 2009, EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011). A exenteração pélvica é o tratamento mais indicado para pacientes com histórico de radiação pélvica (EIFEL, BEREK e MARKMAN, 2011).

O tratamento cirúrgico das pacientes com câncer vaginal promove um menor risco de mortalidade (SHAH *et al.*, 2009). A sobrevivência das pacientes com tumores vaginais em estágio I em 5 anos é de 90% se o tratamento for cirúrgico e 63% se o tratamento for exclusivamente radioterápico. Em estágio II, a sobrevivência é em torno dos 70% quando o tratamento é cirúrgico e 57% após a radioterapia. Em estágio III e IV, a sobrevida figura em 47% das pacientes com câncer vaginal tratadas com cirurgia, 45% das pacientes tratadas com radioterapia, 60% quando os dois procedimentos são combinados e 71% para as poucas pacientes que recebem tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico (BROWN, 2013).

A vacina contra o HPV possui efeito comprovado na prevenção dos tumores relacionados ao HPV16 e 18 (SHUKLA *et al.*, 2009). A vacina quadrivalente é 100% eficiente contra as doenças condilomatosas não oncogênicas e contra NIV e NIVA (GROWDON e CARMEN, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009; TACHEZY *et al.*, 2011; OLSEN *et al.*, 2012; RUMBOLD *et al.*, 2012). Nas populações com alta prevalência de doenças relacionadas ao HPV, a administração profilática universal da vacina em mulheres de 12 a 26 anos é uma estratégia efetiva para reduzir os custos do setor de saúde (GROWDON e CARMEN, 2008). Os custos do setor hospitalar na Dinamarca chegam em média a 24.369 euros gastos em dois anos de tratamento de uma paciente com câncer de vagina e a 20.666 euros gastos em três anos de tratamento de cada paciente com câncer de vulva. Em contraste, são gastos em média 3.306 euros por ano na prevenção de cada paciente (OLSEN *et al.*, 2012).

1.10 – Detecção do HPV nos Tumores de Vulva e de Vagina

Poucos estudos analisaram a prevalência do HPV em tumores de vulva e de vagina. Os estudos dos últimos 10 anos estão sumarizados nas tabelas III e IV. Todos os trabalhos foram realizados com amostras parafinizadas. A prevalência do HPV nos casos de câncer de vulva dos estudos analisados variou de 19,7% a 85% e de 43,7% a 81% nos casos de câncer de vagina. O HPV16 foi o genótipo mais prevalente em todos os estudos, chegando a 100% de prevalência entre as amostras HPV positivas de câncer de vulva e de vagina no estudo de Tsimplaki *et al.* (2012).

Tabela III – Principais trabalhos publicados entre 2003 e 2013 que analisaram a prevalência do HPV em câncer de vulva

Autor(es)	País	Ano de publicação	Ano de coleta dos casos	Número de casos	Método de detecção	Genótipos identificados	HPV+ (%)	Genótipo mais prevalente
KOYAMATSU <i>et al.</i> ,	Japão	2003	1982-1998	31	PCR	6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 e 58 além de outros tipos desconhecidos	12,9	HPV16
HAMPL <i>et al.</i> ,	Alemanha	2006	2000-2006	48	Sequenciamento	6, 16, 18, 31, 33, 68	60,4	HPV16
SUTTON <i>et al.</i> ,	Estados Unidos	2008	1987-2007	116	Hibridização Reversa (Roche Linear Array)	6, 16, 18, 33, 45, 52, 53, 62	69,8	HPV16
INSINGA <i>et al.</i> , (revisão sistemática)	Estados Unidos	2008		197		6,16,18,31 e 33 entre outros	65,3	HPV16
DE VUYST <i>et al.</i> , (Meta-análise)	Vários	2009		1873	PCR		40,4	HPV16
TSIMPLAKI <i>et al.</i> ,	Grécia	2012		6	Microarray (PapilloCheck HPV)		50	HPV16

Tabela IV - Principais trabalhos publicados entre 2003 e 2013 que analisaram a prevalência do HPV em câncer de vagina

Autor(es)	País	Ano de publicação	Ano de coleta dos casos	Número de casos	Método de detecção	Genótipos identificados	HPV+ (%)	Genótipo mais prevalente
KOYAMATSU <i>et al.</i> ,	Japão	2003	1982-1998	16	PCR	6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 e 58 além de outros.	43,75	HPV16
FERREIRA <i>et al.</i> ,	Portugal	2008	1989-2004	21	Hibridização Reversa (INNO LiPA)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 40, 58	81	HPV16
DE VUYST <i>et al.</i> , (Meta-análise)	Vários	2009		136	PCR		69,9	HPV16
TSIMPLAKI <i>et al.</i>	Grécia	2012		4	Microarray (PapilloCheck HPV)		50	HPV16
ALONSO <i>et al.</i> ,	Espanha	2012	1995-2009	57	Hibridização Reversa (INNO LiPA)	16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 58 e 59	70,2	HPV16
LARSSON <i>et al.</i> ,	Suécia	2013	1975-2002	69	PCR em tempo real	18,31,33,45,52,56,58	53,3	HPV16

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar a prevalência do HPV e dos genótipos 16 e 18 em pacientes com carcinomas de vulva e de vagina atendidas no Hospital Araújo Jorge, em Goiânia-Go, Brasil, no período de janeiro de 2005 a julho de 2013, bem como suas associações com os aspectos sociodemográficos e clinicopatológicos dessas pacientes.

2.2 – Objetivos Específicos

Determinar a prevalência do genoma do HPV nos tumores de vulva e de vagina.

Determinar a prevalência dos genótipos HPV16 e HPV18 nos tumores de vulva e de vagina positivos para o HPV.

Avaliar as possíveis associações entre os achados de detecção e genotipagem do HPV e os fatores clínico-epidemiológicos dos tumores de vulva e de vagina.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos Éticos

O presente estudo foi realizado após apreciação e aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás – CEP/AACG sob o número CAAE 13580613.5.0000.0031 (Anexo I). Os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (WHO, 1996) foram respeitados, bem como o sigilo da identidade das pacientes. Os dados das pacientes foram identificados apenas pelos números dos prontuários.

As análises realizadas neste estudo não implicaram em quaisquer modificações no tratamento das pacientes com tumores de vulva e de vagina. A pesquisa foi realizada nos prontuários e pelo manuseio dos respectivos blocos de parafina. Não houve nenhum contato com as pacientes ou familiares. Por ser um estudo retrospectivo, o trabalho foi desenvolvido de forma a não oferecer riscos às pacientes, por isso, não houve necessidade da assinatura de um termo de consentimento.

3.2 – Casuística

A seleção inicial dos casos foi feita por meio de pesquisa nos registros do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. As pacientes que tinham laudos anatomopatológicos com diagnóstico de tumores de vulva e de vagina foram selecionadas. O período de inclusão foi de janeiro de 2005 a julho de 2013. A figura 10 resume as etapas do levantamento casuístico.

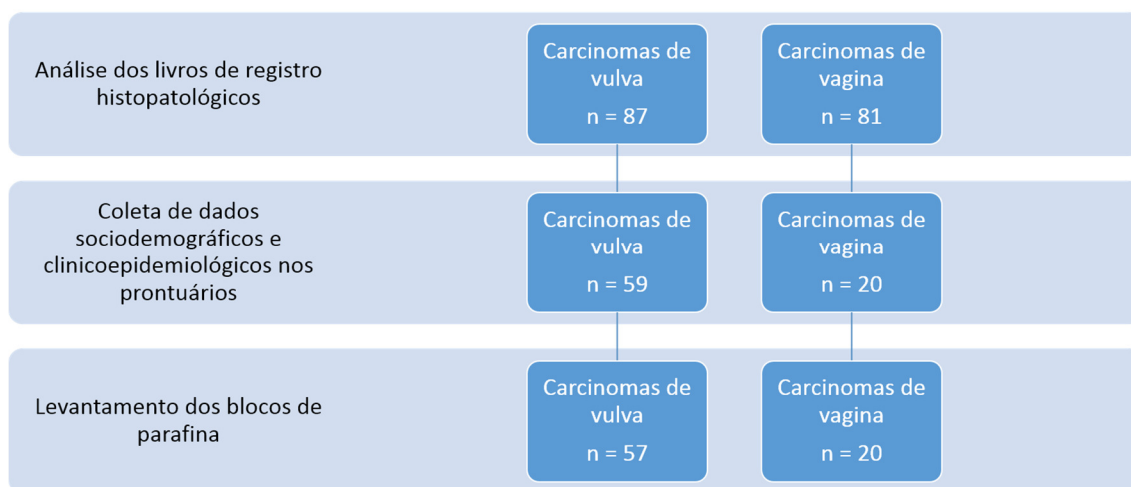


Figura 10: Esquema do levantamento casuístico.

Inicialmente foram levantados 87 casos de tumores de vulva e 81 casos de tumores de vagina nos livros de registro histopatológicos. Os prontuários das pacientes selecionadas foram levantados para coleta de dados sociodemográficos e clinicopatológicos. Os dados pessoais das pacientes incluíram idade à época do diagnóstico, data de nascimento, estado civil, local de nascimento e de origem e hábitos de tabagismo e etilismo. Entre as características clínicas foram analisados os sintomas iniciais, a topografia, o tipo histológico e o tamanho do tumor, o comprometimento de linfonodos regionais, as metástases à distância, o tipo de tratamento e o seguimento das pacientes. Os dados de cada paciente foram coletados em fichas (Anexo II) que foram arquivadas. Todos os casos selecionados foram de tumores primários e invasores ou que ocorreram após cinco anos livre de doença em pacientes com história de outros tumores ginecológicos (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003, BROWN, 2013). Nessa etapa foram excluídos 17 casos de câncer de vulva e 61 casos de câncer de vagina que foram considerados como recidiva ou carcinoma *in situ*.

Os casos que cumpriram os critérios anteriores foram selecionados pela disponibilidade dos respectivos blocos de parafina no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. Apenas três amostras de tumores de vulva não foram encontradas. Portanto, 57 casos de câncer de vulva e 20 casos de câncer de vagina foram elegidos para o desenvolvimento do estudo.

3.3 – Confirmação Histopatológica do Diagnóstico de Câncer de Vulva e de Vagina

As amostras selecionadas consistiam de peças cirúrgicas e biópsias fixadas em formol e incluídas em blocos de parafina. Esses blocos foram submetidos a cortes histológicos de cerca de 4 μm , com os quais foram confeccionadas duas lâminas. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e analisadas por dois patologistas para confirmar os diagnósticos de câncer de vulva e de vagina.

3.4 – Análises Moleculares

Após a confirmação do diagnóstico histopatológico, foram cortados filetes de 0,5 μm de espessura da amostra tumoral para as análises moleculares. Cerca de três a cinco filetes foram armazenados em tubos estéreis de 1,5 mL e identificados de acordo com o número do bloco recortado. A extração de DNA, a detecção do genoma do HPV e a

genotipagem dos HPV16 e 18 foram realizadas com essas amostras. Todas as análises moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Diversidade Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

3.4.1 - Extração do DNA das amostras de Câncer de Vulva e de Vagina

As amostras foram desparafinizadas de acordo com o protocolo já padronizado no Laboratório de Diversidade Genética do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. O DNA das amostras foi isolado com o kit comercial Wizard distribuído pela Promega. O protocolo de desparafinização das amostras e de extração do DNA constam no Anexo III deste trabalho. Os tubos contendo os produtos das extrações foram identificados de acordo com o número do bloco e armazenados a -20°C para sua utilização nas reações em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction* ou PCR).

3.4.2 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é a técnica mais eficaz para a amplificação do DNA extraído de material parafinado. A desparafinização implica na perda de tecido, além de detrimento das moléculas de DNA durante o procedimento. Por isso, o DNA extraído de amostras parafinizadas geralmente se apresenta fragmentado e em pequena quantidade (STEINAU, PATEL e UNGER, 2011). A PCR foi descrita por Kary Mullis em 1983 (SAIKI *et al.*, 1985) e reconhecida com o Prêmio Nobel dez anos depois (WITTEWER e FARRAR, 2011). A técnica se baseia na propriedade da DNA polimerase de sintetizar fragmentos de DNA. Para que a enzima possa atuar *in vitro*, é necessário um DNA molde, oligonucleotídeos iniciadores que marcam o ponto de início da amplificação, desoxirribonucleotídeos que serão acrescentados de acordo com a sequência do molde de DNA e um tampão com sais que mantêm a integridade da DNA polimerase durante o procedimento da PCR (HÜBSCHER *et al.*, 2010). Além disso, uma solução com cátions de cloreto de magnésio também é adicionada à mistura de reagentes para promover a ligação entre os oligonucleotídeos iniciadores e o DNA molde por meio de sua carga positiva.

A PCR ocorre em três etapas: 1) separação das fitas duplas do DNA da amostra, 2) anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores à uma das fitas desnaturadas e 3) alongamento das fitas pelo acréscimo dos desoxirribonucleotídeos pela DNA polimerase.

A partir do segundo ciclo, as moléculas de DNA recém sintetizadas servem como molde para as próximas moléculas de DNA, que aumentam exponencialmente (HÜBSCHER *et al.*, 2010; WITTEWER e FARRAR, 2011). A reação é realizada em um termociclador, no qual a temperatura de cada etapa da PCR pode ser programada. As temperaturas e o número de ciclos variam de acordo com a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores e o fabricante dos reagentes utilizados.

A presença e a integridade do DNA devem ser verificadas em todos os experimentos para evitar falsos resultados negativos devido à ausência de DNA. A verificação é feita por meio da amplificação por PCR de algum gene conhecido. O gene utilizado para o controle endógeno neste estudo foi o da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O segmento de DNA amplificado (amplicon) pelos oligonucleotídeos iniciadores escolhidos contém 99 pares de base (pb) (Tabela V). Todas as amostras cujo resultado inicial foi negativo para GAPDH foram re-extraídas até chegarem ao resultado positivo, para depois prosseguir com a detecção do genoma do HPV.

Tabela V: Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores do gene GAPDH para a confirmação de presença e integridade do DNA

Designação do oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5' -> 3'
GAPDH(F).275	TTGTCATCAATGGAAATCCCATCA
GAPDH(R).374	CAGTGGACTCCACGACGTACTION

Para a detecção do genoma do HPV, foi utilizado um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores SPF 1/2 (do inglês *short PCR fragment*). O SPF 1/2 amplifica um fragmento de 65 pares de base (pb) da região L1 do capsídeo viral do HPV (Tabela VI). Esse conjunto de oligonucleotídeos iniciadores promove a detecção de 39 genótipos de alto e baixo risco oncogênico: 6, 11, 13, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, MM4, MM7, MM8. Os genótipos detectados pelo SPF1/2 são aqueles que infectam a mucosa e, por isso, são mais comuns nas doenças anogenitais (KLETER *et al.*, 1998; KEOWA-ANDERSON *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2013).

Tabela VI: Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores SPF1/2 para detecção do HPV

Designação do oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5' -> 3'
SPF1A	GCiCAGGGiCACAATAATGG
SPF1B	GCiCAGGGiCATAACAATGG
SPF1C	GCiCAGGGiCATAATAATGG
SPF1D	GCiCAAGGiCATAATAATGG
SPF2B-bio	GTiGTATCiACAACAGTAACAAA
SPF2D-bio	GTiGTATCiACTACAGTAACAAA

A genotipagem do HPV16 e do HPV18 foi realizada nas amostras em que o genoma do HPV foi detectado. Os genótipos do HPV 16 e 18 são os mais comuns encontrados em tumores associados ao HPV (VAN DOORN *et al.*, 2006; EKEWOA-ANDERSON *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2013) e, especificamente nos tumores anogenitais (GIULIANO *et al.*, 2008). O amplicon produzido pela amplificação com o conjunto de oligonucleotídeos para a detecção do HPV16 apresenta 108pb e o amplicon do HPV18 apresenta 104pb (Tabela VII). Os dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores amplificam parte da região E7 de cada genótipo do HPV (WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Tabela VII: Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de HPV16 e HPV18.

Designação do oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5' -> 3'
HPV16E7.667	GATGAAATAGATGGTCCAGC
HPV16E7.774	GCTTTGTACGCACAACCGAAGC
HPV18E7.696	AAGAAAACGATGAAATAGATGGA
HPV18E7.799	GGCTTCACACTTACAACACA

Os protocolos de ciclagem e das misturas de reagentes utilizados nas reações de PCR do trabalho estão descritos no Anexo IV. O termociclador *Veriti 384-well Thermal Cycler* fabricado pela *Applied Biosystems* foi utilizado para a termociclagem de todas as amostras. As análises de detecção e genotipagem do HPV foram repetidas no mínimo três vezes em cada amostra para a confirmação do resultado. Os resultados divergentes foram investigados pela repetição da PCR até apresentarem concordância em duas ou mais reações.

3.4.3 – Eletroforese

Os produtos das reações de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante. A eletroforese é um procedimento de separação de biomoléculas pela aplicação de corrente elétrica em uma rede polimérica. As biomoléculas são separadas de acordo com o peso molecular. A análise é baseada em um controle padrão que marca o tamanho de cada banda. O controle positivo consiste em uma amostra conhecida que contém o fragmento de DNA esperado.

Os géis são imersos em TBE 1x (Tris/Borato/EDTA). O TBE é uma solução tampão que contém Tris base, ácido bórico e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Cerca de 5µL a 7µL de cada produto de PCR foi misturado a 5µL do tampão de amostra contendo Azul de Bromofenol a 0,25%. A mistura de amostra e tampão foi aplicada em cada poço do gel de poliacrilamida imerso em TBE. O padrão de peso molecular utilizado foi o marcador de 50 pb (Invitrogen) diluído em água ultra pura autoclavada na proporção de 1:40. Em seguida, os géis foram submetidos a uma voltagem de 100V em um campo elétrico uniforme em posição vertical. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de nitrato de prata. A imagem do gel foi capturada por uma câmera digital para a análise dos resultados da corrida eletroforética. As amostras consideradas positivas foram aquelas que revelaram bandas de qualquer intensidade com o tamanho esperado. As amostras negativas foram as que não revelaram banda alguma. Os protocolos da confecção dos géis e das soluções de coloração estão no Anexo V.

3.5 – Análises dos Dados

Todos os dados das pacientes foram transcritos para planilhas do programa *Microsoft Excel*[®] e arquivados. Os dados clinicopatológicos e sociodemográficos de cada grupo de pacientes (câncer de vulva e câncer de vagina), bem como a presença do genoma do HPV e dos genótipos 16 e 18 nos tumores foram analisados utilizando Teste Exato de Fisher. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 - RESULTADOS

4.1 – Características clinicopatológicas e sociodemográficas das pacientes com câncer de vulva e de vagina

O grupo amostral foi composto por 77 pacientes, sendo 57 pacientes com diagnóstico de tumor invasor primário de vulva e 20 pacientes com diagnóstico de tumor invasor primário de vagina. Os dados sociodemográficos das pacientes estão descritos na Tabela VIII. A idade das pacientes com câncer de vulva variou entre 37 e 90 anos com média de idade de 66 anos ($dp \pm 13,3$). A idade das pacientes com câncer de vagina variou de 27 a 81 anos com média de idade de 60 anos ($dp \pm 13,6$). Não houve diferença significativa entre a idade das pacientes com câncer de vulva e de vagina ($p= 0,7311$). O tabagismo foi significativamente mais prevalente entre as pacientes com câncer de vulva (45,6%) ($p= 0,0110$).

Tabela VIII: Análise das características sociodemográficas das pacientes com câncer de vulva e de vagina.

Variáveis	Carcinomas de vulva (57 casos) n (%)	Carcinomas de vagina (20 casos) n (%)	<i>p</i> *
Idade ao Diagnóstico			
25-50	10 (17,5)	4 (20,0)	0,7311
>50	47 (82,5)	14 (70,0)	
Desconhecido	0	2 (10,0)	
Estado Civil			
Solteira	10 (17,5)	5 (25,0)	0,7222
Casada	22 (38,6)	7 (35,0)	
Viúva/Divorciada	21 (36,8)	6 (30,0)	
Desconhecido	4 (7,0)	2 (10,0)	
Tabagismo			
Sim	26 (45,6)	3 (15,0)	0,0110
Não	22 (38,6)	15 (75,0)	
Não informado	9 (15,8)	2 (10,0)	

*Teste Exato de Fisher

As características clinicopatológicas das pacientes com câncer de vulva e vagina estão descritas na Tabela IX. Com relação ao tipo histológico, os CEC foram mais

prevalentes que os adenocarcinomas (ADN) nos dois grupos de pacientes, correspondendo a mais de 95% dos casos. As metástases linfonodais foram mais prevalentes nos carcinomas de vulva (29,8%) que nos de vagina (5,0%) ($p= 0,0304$). O tratamento das pacientes com câncer de vulva foi essencialmente cirúrgico (82,5%). O tratamento predominante das pacientes com câncer de vagina foi a radioterapia (80%).

Tabela IX: Análise das características clinicopatológicas das pacientes com câncer de vulva e de vagina.

Variáveis	Carcinomas de vulva (57 casos) n (%)	Carcinomas de vagina (20 casos) n (%)	p^*
Tipo Histológico			
Carcinoma espinocelular	56 (98,2)	19 (95,0)	0,4545
Adenocarcinoma	1 (1,8)	1 (5,0)	
Metástase Linfonodal			
Sim	17 (29,8)	1 (5,0)	0,0304
Não	40 (70,2)	19 (95,0)	
Metástase à distância			
Sim	13 (22,8)	7 (35,0)	0,3747
Não	44 (77,2)	13 (65,0)	
Tratamento			
Cirurgia	47 (82,5)	9 (45,0)	0,5994
Radioterapia	20 (35,1)	16 (80,0)	
Quimioterapia	7 (12,3)	6 (30,0)	
Sem tratamento	3 (5,4)	2 (10,0)	
Grau de diferenciação			
I (bem diferenciado)	9 (15,8)	3 (15,0)	0,3858
II (moderadamente diferenciado)	32 (56,1)	5 (25,0)	
III (pouco diferenciado)	8 (14,0)	3 (15,0)	
Desconhecido	8 (14,0)	9 (45,0)	
Óbito			
Sim	10 (17,5)	3 (15,0)	0,5365
Não	46 (80,7)	17 (85,0)	
Desconhecido	1 (1,8)	0	
Margens cirúrgicas			
Livres	27 (57,4)	2 (22,2)	0,5670
Comprometidas	10 (21,3)	2 (22,2)	
Não avaliado	10 (21,3)	5 (55,6)	

*Teste Exato de Fisher

As Figuras 10 e 11 mostram os locais de metástase à distância dos tumores de vulva e de vagina. A presença de metástases à distância não foi diferente nos dois grupos de tumores avaliados, ou seja, nos tumores de vulva, 13 casos (22,8%) eram metastáticos, enquanto nos de vagina, 7 casos (35%) apresentaram metástase ($p= 0,3747$) (Tabela IX).

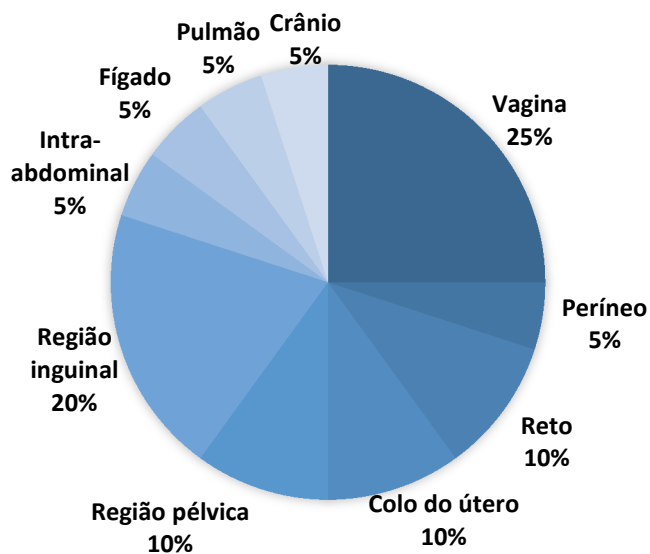


Figura 11 - Distribuição dos locais de metástase à distância (n= 13 casos) dos tumores de vulva em pacientes atendidas no Hospital Araújo Jorge entre janeiro de 2005 e julho de 2013. Algumas pacientes tiveram metástase para mais de um local.

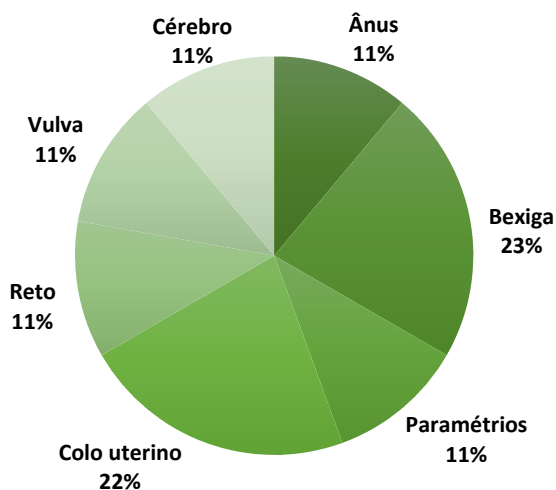


Figura 12 - Distribuição dos locais de metástase à distância (n= 7 casos) dos tumores de vagina em pacientes atendidas no Hospital Araújo Jorge entre janeiro de 2005 e julho de 2013. Algumas pacientes tiveram metástase para mais de um local.

Nem todos os dados de clinicopatológicos das pacientes estavam disponíveis nos respectivos prontuários. Em relação ao tratamento, o seguimento de duas pacientes de cada grupo foi perdido. O grau de diferenciação não foi discriminado nos laudos histopatológicos em 14% das pacientes com câncer de vulva e em 45% das pacientes com câncer de vagina.

4.2 – Detecção de HPV e genotipagem dos HPV16 e 18 nas amostras de câncer de vulva e de vagina.

A prevalência do HPV nas amostras de câncer de vulva foi de mais de 89%. O genótipo HPV16 foi detectado em 41,2% dos casos positivos para o HPV e o HPV18 em 21,6%. A infecção simultânea com os dois genótipos ocorreu em 12% das amostras HPV positivas. Os aspectos sociodemográficos e clinicopatológicos das pacientes com carcinomas de vulva positivos para o HPV foram comparados com os HPV negativos para a investigação de possíveis diferenças (Tabela X). Dentre os carcinomas de vulva positivos para o HPV, foram comparados ainda os aspectos potencialmente associados aos os genótipos HPV16 e HPV18. Não foram observadas diferenças significativas entre os carcinomas de vulva positivos e negativos para o HPV em relação aos aspectos sociodemográficos e clinicopatológicos das pacientes (Tabela X).

Tabela X: Análise dos dados clinicoepidemiológicos e sociodemográficos das pacientes com câncer de vulva em relação à prevalência do HPV e dos genótipos 16 e 18.

Variável	HPV+ (n = 51) n (%)	HPV- (n = 6) n (%)	p*	HPV16+ (n = 21) n (%)**	HPV18+ (n = 11) n (%)**	p*
Idade ao diagnóstico						
25-50	10 (100)	0	0,5776	5 (50,0)	3 (30,0)	0,9993
>50	41 (87,3)	6 (12,8)		16 (39,0)	8 (19,5)	
Estado Civil						
Solteira	10 (100)	0	0,5363	5 (50,0)	2 (20,0)	0,6478
Casada	20 (90,9)	2 (9,1)		7 (35,0)	7 (35,0)	
Divorciada/ Viúva	18 (85,7)	3 (14,3)		8 (44,4)	2 (11,1)	
Desconhecido	3 (75,0)	1 (25,0)		1 (33,3)	1 (33,3)	
Tabagismo						
Sim	25 (96,2)	1 (3,8)	0,0806	12 (48,0)	6 (24,0)	1,0000
Não	17 (77,3)	5 (22,7)		6 (35,3)	4 (23,5)	
Não informado	9 (100)	0		3 (33,3)	2 (22,2)	
Tipo Histológico						
Carcinoma espinocelular	50 (89,3)	6 (10,7)	1,0000	21 (42,0)	12 (24,0)	1,0000
Adenocarcinoma	1 (100)	0		0	0	
Metástase Linfonodal						
Sim	15 (88,2)	2 (11,8)	0,9928	4 (26,7)	3 (20,0)	0,9998
Não	36 (90,0)	4 (10,0)		17 (47,2)	9 (25,0)	
Metástase à distância						
Sim	12 (92,3)	1 (7,7)	1,0000	3 (25,0)	3 (25,0)	0,6434
Não	39 (88,6)	5 (11,4)		18 (46,2)	9 (23,1)	
Tratamento						
Cirurgia	43 (91,5)	4 (8,5)	1,0000	18 (41,9)	9 (20,9)	1,0000
Radioterapia	18 (90,0)	2 (10,0)		9 (50,0)	5 (27,8)	
Quimioterapia	7 (100)	0		3 (42,9)	2 (28,6)	
Sem tratamento	3 (100)	0		0	0	
Margens cirúrgicas						
Livres	25 (92,6)	2 (7,4)	0,9846	10 (10,0)	5 (20,0)	1,0000
Comprometidas	9 (90,0)	1 (10,0)		4 (44,4)	1 (11,1)	
Não avaliado	9 (90,0)	1 (10,0)		4 (44,4)	3 (33,3)	
Grau de diferenciação						
I (bem diferenciado)	7 (77,8)	2 (22,2)	0,0541	1 (14,3)	1 (14,3)	1,0000
II (moderadamente diferenciado)	28 (87,5)	4 (12,5)		14 (50,0)	8 (28,6)	
III (pouco diferenciado)	8 (100)	0		1 (12,5)	2 (25,0)	
Desconhecido	8 (100)	0		5 (62,5)	1 (12,5)	
Óbito						
Sim	9 (90,0)	1 (10,0)	1,0000	4 (44,4)	3 (33,3)	0,9998
Não	41 (89,1)	5 (10,9)		17 (41,5)	9 (22,0)	
Desconhecido	1 (100)	0		0	0	

*Teste Exato de Fisher

**A frequência do HPV16 e 18 foi expressa como porcentagem das amostras positivas para o HPV

A Tabela XI mostra a análise das características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com câncer de vagina em relação à infecção pelo HPV e aos genótipos HPV16 e 18. A prevalência do HPV nas amostras de câncer de vagina foi de 90%. Dentre estas, 55,6% eram infecções pelo HPV16 e 16,7% pelo HPV18. A infecção simultânea pelos dois genótipos ocorreu em 6% das amostras de câncer vaginal positivas para o HPV. Uma diferença significativa entre as pacientes com câncer de vagina HPV positivas e negativas foi observada em relação ao óbito ($p= 0,0158$).

Tabela XI: Análise dos dados clinicoepidemiológicos e sociodemográficos das pacientes com câncer de vagina em relação à prevalência do HPV e dos genótipos 16 e 18.

Variável	HPV+ (n = 18) n (%)	HPV- (n = 2) n (%)	p*	HPV16+ (n = 10) n (%)**	HPV18+ (n = 3) n (%)**	p*
Idade ao diagnóstico						
25-50	4 (100)	0		2 (50,0)	0	
>50	12 (85,7)	2 (14,3)	1,0000	6 (50,0)	3 (25,0)	1,0000
Desconhecido	2 (100)	0		2 (100)	0	
Estado Civil						
Solteira	4 (80,0)	1 (20,0)		1 (25,0)	1 (25,0)	
Casada	7 (100)	0	1,0000	4 (57,1)	2 (28,6)	1,0000
Viúva	5 (83,3)	1 (16,7)		4 (80,0)	0	
Desconhecido	2 (100)	0		1 (50,0)	0	
Tabagismo						
Sim	2 (66,7)	1 (33,3)		2 (100)	0	
Não	14 (93,3)	1 (6,7)	0,3137	7 (50,0)	1 (7,1)	1,0000
Não informado	2 (100)	0		1 (50,0)	2 (100)	
Tipo Histológico						
Carcinoma espinocelular	17 (89,5)	2 (10,5)	1,0000	9 (52,9)	3 (17,6)	1,0000
Adenocarcinoma	1 (100)	0		1 (100)	0	
Metástase Linfonodal						
Sim	1 (100)	0	1,0000	1 (100)	0	1,0000
Não	17 (89,5)	2 (10,5)		9 (52,9)	3 (17,6)	
Metástase à distância						
Sim	6 (85,7)	1 (14,3)	1,0000	3 (50,0)	1 (16,7)	0,9860
Não	12 (92,3)	1 (7,7)		7 (58,3)	2 (16,7)	
Tratamento						
Cirurgia	9 (81,8)	2 (18,2)		6 (66,7)	2 (22,2)	
Radioterapia	14 (87,5)	2 (12,5)	0,5407	9 (64,3)	1 (7,1)	0,9973
Quimioterapia	4 (66,7)	2 (33,3)		2 (50,0)	1 (25,0)	
Sem seguimento	2 (100)	0		1 (50,0)	1 (50,0)	
Margens cirúrgicas						
Livres	2 (100)	0		1 (50,0)	0	
Comprometidas	2 (100)	0	1,0000	2 (100)	0	1,0000
Exíguas/Não avaliado	5 (100)	0		1 (20,0)	1 (20,0)	
Grau de diferenciação						
I (bem diferenciado)	3 (100)	0		0	1 (33,3)	
II (moderadamente diferenciado)	5 (100)	0	0,5333	3 (60,0)	1 (20,0)	0,2857
III (pouco diferenciado)	1 (33,3)	2 (66,7)		1 (100)	0	
Desconhecido	9 (100)	0		6 (66,7)	1 (11,1)	
Óbito						
Sim	1 (33,3)	2 (66,7)	0,0158	1 (100)	0	1,0000
Não	17 (100)	0		9 (52,9)	3 (17,6)	

*Teste Exato de Fisher

**A frequência do HPV16 e 18 foi expressa como porcentagem das amostras positivas para o HPV

5 – DISCUSSÃO

Estudos que investigam a prevalência do HPV em câncer de vulva e vagina são bastante limitados devido à baixa incidência desses tumores e à falta de exames preventivos para essas doenças. O nosso estudo apresenta a segunda maior casuística de câncer de vulva e a quarta maior de câncer de vagina disponível na literatura nos últimos dez anos (Tabelas III e IV) e é inédito no Brasil. O estudo descreveu os dados sociodemográficos e clinicopatológicos de 57 pacientes com câncer de vulva e 20 pacientes com câncer de vagina, bem como a infecção pelo HPV e a prevalência dos genótipos HPV16 e HPV18 nesses tumores (Tabelas VIII, IX, X e XI).

As análises estatísticas dos dados deste estudo apontaram uma diferença significativa em relação às pacientes com câncer de vulva tabagistas ($p= 0,0110$) (Tabela VIII). Uma maior proporção de metástases linfonodais foi observada em pacientes com câncer de vulva ($p= 0,0304$) (Tabela IX). Uma relação entre o grau de diferenciação tumoral e a presença do HPV em pacientes com câncer de vulva foi sugerida ($p= 0,0541$) (Tabela X). Um melhor prognóstico para as pacientes com câncer de vagina HPV positivas foi constatado ($p= 0,0158$) (Tabela XI).

Em relação ao tabagismo, observou-se que este hábito esteve significativamente associado às pacientes com câncer de vulva ($p= 0,0110$) (Tabela VIII). O tabagismo é descrito como um dos principais fatores etiológicos para o desenvolvimento do CEC vulvar (WILKINSON e TEIXEIRA, 2003; HAMPL *et al.*, 2006; HOEVENAARS *et al.*, 2008, SUTTON *et al.*, 2008; RUMBOLD *et al.*, 2012; DEL PINO *et al.*, 2013) e tem sido encontrado associado também ao câncer vaginal (DALING *et al.*, 2002). A associação entre o tabagismo e a infecção pelo HPV é pesquisada como fator etiológico de outros tumores (VACCARELLA *et al.*, 2008; AGUIAR *et al.*, 2014), mas não foi demonstrada em nosso estudo (Tabelas X e XI).

A análise dos dados clinicopatológicos das pacientes com câncer de vulva e de vagina demonstrou diferença significativa para a presença de metástases linfonodais ($p= 0,0304$), com maior prevalência nos carcinomas de vulva (29,8%) (Tabela IX), concordando com estudos prévios (SUTTON *et al.*, 2008). O comprometimento linfonodal é o fator prognóstico mais utilizado para planejar o tratamento dos tumores de vulva (KOWALEWSKA *et al.*, 2012, BROWN, 2013).

Uma alta taxa de metástases à distância foi observada nas pacientes deste trabalho (Tabela IX). A literatura relata que os tumores de vulva apresentam uma maior proporção de metástase à distância comparado a outros locais da pele (BROWN, 2013). De fato, os tumores de vulva metastatizaram para mais locais em comparação aos tumores de vagina (Figuras 10 e 11). No entanto, um maior número de pacientes com câncer de vagina teve metástases em relação às pacientes com câncer de vulva (35% e 23%, respectivamente), embora não tenha havido diferença significativa entre os dois grupos (Tabela IX).

Neste estudo, a prevalência do HPV encontrada nas amostras de câncer de vulva e de vagina foi maior que a relatada em outros estudos (KOYAMATSU *et al.*, 2003; HAMPL *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008; INSINGA *et al.*, 2008; SUTTON *et al.*, 2008; DE VUYST *et al.*, 2009; ALONSO *et al.*, 2012; TSIMPLAKI *et al.*, 2012; LARSSON *et al.*, 2013) (Tabelas X e XI). Essa diferença se deve ao emprego de técnicas com menor sensibilidade para a detecção do genoma viral nos outros estudos. Diferentes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores são amplamente utilizados para a detecção do genoma do HPV. No entanto, a maioria destes conjuntos não permite uma detecção adequada do espectro de genótipos do HPV que infecta o trato anogenital. O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizado no presente estudo amplifica parte da região L1 de 39 genótipos do HPV encontrados em tumores anogenitais (KLETER *et al.*, 1998). Além do mais, todos os estudos investigados utilizaram amostras parafinizadas. Quando o DNA é extraído de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, a amplificação de um fragmento menor de DNA é mais provável, pois o DNA geralmente encontra-se fragmentado e em menor quantidade que em amostras processadas a fresco (STEINAU, PATEL e UNGER, 2011). O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizado no presente estudo amplifica um fragmento de 65 pb, e esta metodologia certamente possibilita uma maior detecção do genoma viral.

A exemplo de outros estudos (ALONSO *et al.*, 2012, LARSSON *et al.*, 2013), a prevalência do HPV nos tumores de vagina foi maior que nos tumores de vulva (90% e 89%, respectivamente). No entanto, essa diferença não foi significativa, como a relatada nos demais estudos. Esses resultados podem inferir que, assim como o câncer vulvar, o câncer vaginal possui duas vias etiológicas e uma delas não está associada ao HPV. Os tumores do colo uterino que evoluem por meio de uma única via, apresentam uma prevalência do HPV de 100% (GROWDON e CARMEN, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009). Outra

possibilidade que vem sendo abordada é que o carcinoma vaginal possua características transicionais entre os tumores vulvar e cervical (KOMAYATSU *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2008), justificando esses resultados.

Uma diferença significativa foi estabelecida entre pacientes com câncer de vagina HPV positivas e negativas em relação ao óbito ($p= 0,0158$) (Tabela XI). Vários estudos relatam associações entre a infecção pelo HPV e a sobrevida das pacientes com câncer de vagina (ALONSO *et al.*, 2012). Embora a sobrevida das pacientes do estudo não tenha sido analisada, os resultados deste estudo demonstram que a infecção pelo HPV representa um melhor prognóstico em pacientes com câncer de vagina.

Mais de 70% das pacientes com câncer de vulva e de vagina positivas para a detecção do HPV tinham mais de 50 anos (Tabelas X e XI). A grande maioria dos estudos epidemiológicos demonstra que a prevalência da infecção pelo HPV em tumores de vulva e de vagina é maior nas pacientes com idade inferior a 50 anos (HAMPL *et al.*, 2006; GROWDON e CARMEN, 2008; WOELBER *et al.*, 2009; BAUMANN *et al.*, 2010; ALONSO *et al.*, 2012; OLSEN *et al.*, 2012; RUMBOLD *et al.*, 2012). No entanto, na América do Norte, não existe diferença entre as faixas etárias das pacientes com câncer de vulva e vagina em relação à presença do HPV (SUTTON *et al.*, 2008; DE VUYST *et al.*, 2009), o que pode indicar que a prevalência do HPV está aumentando em mulheres mais idosas.

O baixo grau de diferenciação também parece influenciar na progressão do câncer vulvar em alguns casos, sugerindo um pior prognóstico (BROWN, 2013). Acredita-se que quanto menor a diferenciação celular, maior a prevalência do HPV, pois o vírus infecta células jovens em processo proliferativo (MUÑOZ *et al.*, 2006). No presente estudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a diferenciação tumoral e a infecção pelo HPV nas amostras de câncer de vulva e de vagina analisadas (Tabelas X e XI).

A prevalência do HPV16 nas amostras de câncer de vulva e de vagina avaliadas neste estudo foi próxima à encontrada em outros estudos semelhantes (KOYAMATSU *et al.*, 2003; HAMPL *et al.*, 2008; SUTTON *et al.*, 2008; INSINGA *et al.*, 2008; DE VUYST *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008; TSIMPLAKI *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2012; LARSSON *et al.*, 2013), portanto, o HPV16 foi o mais prevalente nas amostras analisadas por este estudo, mesmo que a genotipagem dos demais tipos não tenha sido realizada.

Com base nos resultados apresentados, estima-se que a vacina contra o HPV poderia ter prevenido 58% dos casos de câncer de vulva e 65% dos casos de câncer de vagina da nossa série. A vacina contra o HPV previne a infecção pelos genótipos 16 e 18 e tem demonstrado alta eficiência na prevenção de tumores relacionados a esses genótipos virais (GROWDON e CARMEN, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009; TACHEZY *et al.*, 2011; OLSEN *et al.*, 2012; RUMBOLD *et al.*, 2012).

O pequeno número de casos clínicos e a baixa disponibilidade de artigos científicos relacionados ao câncer de vulva e vagina e sobre sua incidência principalmente no Brasil dificultam as pesquisas sobre esses tumores. Os cânceres de vulva e de vagina são raros e não apresentam exames clínicos preventivos de rotina, como o câncer do colo do útero. A pequena incidência dificulta o conhecimento da história natural desses tumores e leva à menor produção científica em relação a esse tema. A falta de algumas informações nos registros médicos diminui as chances da elucidação da história natural dos tumores de vulva e de vagina. Em nossa pesquisa, dados como paridade, abortos, tratamento de reposição hormonal, uso de contraceptivos, história de neoplasias familiares e cirurgias anteriores aos tumores foram pesquisados, porém, foram encontrados apenas na minoria dos prontuários. Outros dados que poderiam estar associados ao desenvolvimento dos tumores como etilismo, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais e diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis também não estavam disponíveis e, consideramos essa carência de dados a maior limitação deste estudo.

Futuros estudos com câncer de vulva e vagina devem considerar a genotipagem dos demais tipos de HPV nas amostras, a subclassificação histológica dos carcinomas, a identificação histopatológica das lesões adjacentes aos tumores e uma maior casuística. Esses fatores em conjunto poderiam contribuir para um melhor entendimento da história natural do câncer de vulva e de vagina.

6 – CONCLUSÕES

- A prevalência do HPV nos tumores de vulva foi de 89% e nos tumores de vagina foi de 90%.
- O HPV16 foi encontrado em 42% dos tumores de vulva positivos para o HPV e em 56% dos tumores de vagina positivos para o HPV.
- A prevalência do HPV18 dos tumores de vulva positivos para o HPV foi de 24% e de 18% nos tumores de vagina positivos para o HPV.
- Com relação aos aspectos sociodemográficos, observou-se que a maioria dos tumores de vulva e de vagina acometeram mulheres com idades acima de 50 anos e que o tabagismo esteve associado significativamente aos tumores de vulva.
- Com relação aos aspectos clinicoepidemiológicos, observou-se que os carcinomas de células escamosas foram os mais prevalentes nos dois sítios anatômicos e que os carcinomas de vulva apresentaram significativamente mais metástases linfonodais que os carcinomas de vagina.
- No que diz respeito à detecção e genotipagem do HPV, nenhuma diferença significativa foi observada entre as características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes avaliadas e a presença do genoma viral nos carcinomas de vulva e de vagina.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. et al. Clinicopathological aspects and prevalence of human papillomavirus in anal cancer. **Journal of Coloproctology**, 2014.

ALBERTS, B. et al. Chapter 20 - Cancer. In: **Molecular Biology of the Cell**, 5th. ed. p. 1725, New York, USA: Garland Science, 2008.

ALONSO, I. et al. Human papillomavirus as a favorable prognostic biomarker in squamous cell carcinomas of the vagina. **Gynecologic oncology**, v. 125, n. 1, p. 194-9, abr. 2012.

ANDERSEN. E. S. et al. Tumours of the Vagina - Epithelial Tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

BAGGISH, M. S.; KARRAM, M. M. **Atlas of Pelvic Anatomy and Gynecologic Surgery**. 3rd. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2010. p. 1424

BAUMANN, K. H. et al. Small-area analysis of incidence and localisation of vulvar cancer. **Journal of oncology**, v. 2010, p. 512032, 5 jan. 2010.

BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, 2010.

BOYD, J. et al, Molecular genetic analysis of clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix associated and unassociated with diethylstilbestrol exposure in utero. **Cancer**, 1996.

BROWN, N. Squamous Cell Carcinoma and Basal Cell Carcinoma of the Vulva and Squamous Cell Carcinoma of the Vagina. In: **Pathology of the Vulva and Vagina**. Springer-Verlag London, 2013.

BRUCHIM, I. et al. HPV-related vulvar intraepithelial neoplasia: outcome of different management modalities. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 99, n. 1, p. 23-7, 1 out. 2007

DALING, J. R. et al. A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. **Gynecologic oncology**, v. 84, n. 2, p. 263-70, 5 fev. 2002.

DARRAGH, T. M.; COLGAN, T. J.; COX..., J. T. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. **Arch Pathol Lab Med**, v. 136, out 2012.

DELIVELIOTOU, A.; CRETSAS, G. Anatomy of the Vulva. **The Vulva. Anatomy, Physiology and Pathology**, p. 1-7, 2006.

DEMIRALAY, E. et al. Vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar squamous cell carcinoma: a clinicopathologic study of 18 cases. **journal of Cancer Therapeutics and Research**, v. 1, n. 1, p. 24, 2012.

DEL PINO, M.; RODRIGUEZ-CARUNCHIO, L.; ORDI, J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 62, n. 1, p. 161-75, 2 jan. 2013

DE MELO MAIA, B. et al. Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 150, jan. 2012.

DE VUYST, H. et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626-36, 3 abr. 2009.

DISTRIBUIÇÃO do número de casos novos, segundo localização primária, por ano e sexo. **Câncer no Brasil: Dados do Registro de Base Populacional. Goiânia, 2003.** Disponível em . Acesso em: 30 mar. 2013.

EIFEL, P. J.; BEREK, J. S.; MARKMAN, M.A. Carcinoma of the Vagina. In: **Cancer Principles & Practice of Oncology**, 9ª ed, 2011.

EISENBERG, A. L. A. **TNM: classificação de tumores malignos - Tradução de: TNM: classification of malignant tumours.** 6. ed. Rio de Janeiro, Brasil: INCA, 2004. p. 254

EKEOWA-ANDERSON, A. L. et al. AKT1 loss correlates with episomal HPV16 in vulval intraepithelial neoplasia. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38608, jan. 2012.

FARAGE, M.; MAIBACH, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of gynecology and obstetrics**, 2006.

FERRARO, C. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, 2011.

FERREIRA, M. et al. HPV DNA detection and genotyping in 21 cases of primary invasive squamous cell carcinoma of the vagina. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 21, n. 8, p. 968-72, 5 ago. 2008.

FRAZER, I. H. HPV vaccines. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. 81-88, 2006.

GAUDINEAU, A. et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery in locally advanced squamous cell carcinoma of the vulva. **Oncology letters**, v. 4, n. 4, p. 719-722, 1 out. 2012.

GIULIANO, A. R. et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. **Vaccine**, v. 26 Suppl 10, p. K17-28, 2 ago. 2008.

GROWDON, W. B.; CARMEN, M. D. Human papillomavirus-related gynecologic neoplasms: screening and prevention. 2008.

HACKER, N.; EIFEL, P.; VELDEN, J. VAN DER. Cancer of the vagina. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, 30 set 2012.

HAMPL, M. et al. Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. **Obstetrics and gynecology**, v. 108, n. 6, p. 1361-8, 5 dez. 2006.

HAN, J. J. e KOHN, E. C. The new FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas. Acesso em 01 de maio de 2012. Disponível em <http://www.medscape.com/viewarticle/722721>.

HATCH, E.E. et al. Incidence of squamous neoplasia of the cervix and vagina in women exposed prenatally to diethylstilbestrol (United States). **Cancer causes & control**, 2001.

HOEVENAARS, B. M. et al. A panel of p16(INK4A), MIB1 and p53 proteins can distinguish between the 2 pathways leading to vulvar squamous cell carcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 123, n. 12, p. 2767-73, 1 dez. 2008.

HÜBSCHER, U. et al. DNA Polymerases: Discovery, Characterization and Functions in Cellular DNA Transactions. **World Scientific**, 2010.

INSINGA, R. P.; DASBACH, E. J.; ELBASHA, E. H. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. **BMC infectious diseases**, v. 9, p. 119, 4 jan. 2009.

JACOBELLI, S. et al. Anti-HPV16 E2 protein T-cell responses and viral control in women with usual vulvar intraepithelial neoplasia and their healthy partners. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36651, jan. 2012.

JEMAL, A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 3, p. 175-201, 3 fev. 2013.

JONES, R. W.; ROWAN, D. M.; STEWART, A. W. Vulvar Intraepithelial Neoplasia Aspects of the Natural History and Outcome in 405 Women. **OBSTETRICS & GYNECOLOGY**, v. 106, p. 1319- 1326, 6 dez 2005.

JUNG, Y.-S. S.; KATO, I.; KIM, H.-R. C. R. A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial-mesenchymal transition. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 435, n. 3, p. 339-44, 5 jun. 2013.

KEMPSON, R. L.; TEIXEIRA, M. R.; HENDRICKSON, M. R. Tumours of the Vulva - Mesenchymal tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

KLEMBA, A. et al. Vulvar cancer as a target for molecular medicine. **Frontiers in Bioscience** S3, p. 136-144, 1 jan 2011.

KLETER, B.; VAN, L. J.; TER, J. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. **American Journal of Pathology**, v. 153, 6 dez 1998.

KOTSOPOULOS, I. C. et al. Implication of human papillomavirus-66 in vulvar carcinoma: a case report. **Journal of medical case reports**, v. 5, p. 232, 6 jan. 2011.

KOWALEWSKA, M. et al. Estimation of groin recurrence risk in patients with squamous cell vulvar carcinoma by the assessment of marker gene expression in the lymph nodes. **BMC cancer**, v. 12, p. 223, jan. 2012.

KOYAMATSU, Y. et al. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. **Gynecologic Oncology**, v. 90, 2003.

LARSSON, G. L. et al. Prognostic impact of human papilloma virus (HPV) genotyping and HPV-16 subtyping in vaginal carcinoma. **Gynecologic oncology**, v. 129, n. 2, p. 406-11, 3 maio 2013.

LIU, X. et al. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2009.

MELNICK, S. et al. Rates and Risks of Diethylstilbestrol-Related Clear-Cell Adenocarcinoma of the Vagina and Cervix. **New England Journal of Medicine**, 1987.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, 4 ago. 2006.

NELSON, E. L.; STOCKDALE, C. K. Vulvar and vaginal HPV disease. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 359-76, 6 jun. 2013.

NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L. The biology of human papillomaviruses. **Current problems in dermatology**, v. 45, p. 19-32, 3 jan. 2014.

NIEBLER, M. et al. Post-Translational Control of IL-1 β via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003536, 4 ago. 2013.

OLSEN, J. et al. Incidence and cost of anal, penile, vaginal and vulvar cancer in Denmark. **BMC public health**, v. 12, p. 1082, jan. 2012.

OPARKA, R.; HERRINGTON, C. S. Precursors of Vulvovaginal Squamous Cell Carcinoma. In: **Pathology of the Vulva and Vagina**. Springer-Verlag London, 2013.

ÖSTÖR, A. G. Tumours of the Vagina - Mesenchymal tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/11-25, 4 ago. 2006.

POLCHEIRA, P. A. et al. Protocolo de Conduta em Ginecologia Oncótica. **Unidade de Ginecologia Oncológica do Hospital de Base do Distrito Federal**, 2010.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1 fev. 1999.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C.; CHILLÓN, R.; DÍEZ-MORENO, S.; GUERRA-TAPIA, A. Prevalence and Genotypic Identification of Human Papillomavirus Infection in a Population from Northwestern Spain. **Open Dermatology Journal**, Vol. 3, p18, 2009.

RUBIN, P.; HANSEN, J. T. Vagina Perspective, Patterns of Sread, and Pathology. In: **TNM Staging Atlas with Oncoanatomy**, 2nd. ed. Philadelphia, PA: 2012.

TNM Staging Atlas with Oncoanatomy. 7ª Edição, 2012. Philip Rubin e John T. Hansen. Capítulo 47: Vagina, Seção Orientation of Three-Planar Oncoanatomy.

RUMBOLD, A. R. et al. Investigating a cluster of vulvar cancer in young women: a cross-sectional study of genital human papillomavirus prevalence. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 243, jan. 2012.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, 5 dez. 1985.

SHAH, C. A. et al. Factors affecting risk of mortality in women with vaginal cancer. **Obstetrics and gynecology**, v. 113, n. 5, p. 1038-45, 5 maio 2009.

SHUKLA, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **Indian J Med Res**, v. 130, p. 222-223, set 2009.

SIDERI, M. et al. Squamous Vulvar Intraepithelial Neoplasia 2004 Modified Terminology, ISSDV Vulvar Oncology Subcommittee. **The Journal of the Reproductive Medicine**, v.50, n. 11, p. 807-810, nov. 2005.

SILVERBERG, S. G. Tumours of the Vagina - Mixed epithelial and mesenchymal tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

SINGH, N. Development and Anatomy: Disorders of the Development. In: **Pathology of the Vulva and Vagina**. Springer-Verlag London, 2013.

STEINAU, M.; PATEL, S. S.; UNGER, E. R. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 13, n. 4, p. 377-81, 5 jul. 2011.

SUTTON, B. C. et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 21, n. 3, p. 345-54, 6 mar. 2008.

TACHEZY, R. et al. Human papillomavirus genotype distribution in Czech women and men with diseases etiologically linked to HPV. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21913, 6 jan. 2011.

TSIMPLAKI, E. et al. Human papillomavirus genotyping and e6/e7 mRNA expression in greek women with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vagina and vulva. **Journal of oncology**, v. 2012, p. 893275, jan. 2012.

VACCARELLA, S. et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. **International journal of epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 536-46, jun. 2008.

VAN DE NIEUWENHOF, H. P. et al. The etiologic role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 7, p. 2061-7, 3 jul. 2009.

VAN DEN EINDEN, L. C. et al. Cytology of the vulva: feasibility and preliminary results of a new brush. **British journal of cancer**, v. 106, n. 2, p. 269-73, 2 jan. 2012.

VAN DOORN, L.-J. J. et al. Highly effective detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad-spectrum and type-specific PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3292-8, 5 set. 2006.

VANG, R.; TAVASSOLI, F. A.; ANDERSEN. E. S. et al. Tumours of the Vagina - Melanotic, neuroectodermal, lymphoid and secondary tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

VAN RANST, M.; KAPLAN, J. B.; BURK, R. D. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. **The Journal of general virology**, v. 73 (Pt 10), p. 2653-60, 4 out. 1992.

VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, 2004.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of pathology**, v. 189, n. 1, p. 12-9, 3 set. 1999.

WEIDERPASS, E.; LABRÈCHE, F. Malignant tumors of the female reproductive system. **Safety and health at work**, v. 3, n. 3, p. 166-80, 6 set. 2012.

WELLENHOFER, A.; BRUSTMANN, H. Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Vulvar Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study with Survivin and p53. **Arch Pathol Lab Med**, v. 136, p 1359-1365, nov. 2012.

WILKSON, E. J.; TEIXEIRA, M. R. Tumours of the Vulva - Epithelial tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

WILKSON, E. J.; TEIXEIRA, M. R. Tumours of the Vulva - Melanocytic tumours. In: **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2003. v. 5p. 430.

WITTEWER, C. T.; FARRAR, J. S. Magic in Solution: an Introduction and Brief History of PCR. Capítulo 1. In: **PCR Troubleshooting and Optimization The Essential Guide**. 2011.

WOELBER, L. et al. Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. **Anticancer research**, v. 29, n. 2, p. 545-52, fev. 2009.

WORLD MEDICAL ORGANIZATION. Declaration of Helsinki. **British Medical Journal**, vol. 313, dez 1996.

WU, X. et al. Descriptive epidemiology of vaginal cancer incidence and survival by race, ethnicity, and age in the United States. **Cancer**, v. 113, n. 10 Suppl, p. 2873-82, 6 nov. 2008.

ZOBEL, T.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 22, p. 8352-62, 6 nov. 2003.

Anexo III- Protocolo de Desparafinização e Extração do DNA

Desparafinização das Amostras

1. Colocar um fragmento de tecido em um tubo de 1,5 mL e adicionar 500 μ L de xileno. Incubar por 15 minutos a 65°C.
2. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos para formar um *pellet* de tecido. Descartar o xileno.
3. Repetir as etapas 1 e 2 mais duas vezes para completar o processo de remoção da parafina.
4. Adicionar 500 μ L de etanol 100% e incubar por 15 minutos a 65°C.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos para formar um *pellet* do tecido. Descartar o etanol.
6. Repetir as etapas 4 e 5 mais duas vezes para completar a remoção da parafina.

Lise Celular

1. Adicionar 200 μ L de solução de lise celular, macerando o tecido com a ponteira.
2. Adicionar ao lisado 10 μ L de proteinase K (20mg/mL).
3. Misturar o conteúdo homogeneizando com a ponteira e incubar a 65°C até completar a digestão.

Precipitação de Proteínas

1. Resfriar as amostras a temperatura ambiente.
2. Adicionar 50 μ L de solução de precipitação de proteínas ao lisado de células e homogeneizar com a ponteira.
3. Incubar a -20°C durante 15 minutos.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos.

Precipitação do DNA

1. Transferir o sobrenadante com o DNA para um microtubo de 1,5 mL limpo e adicionar 200 μ L de isopropanol 100%.
2. Misturar bem por inversão
3. Incubar durante uma hora.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Descartar o isopropanol por inversão.
5. Secar o tubo sobre um papel absorvente durante 15 minutos.
6. Adicionar 200 μ L de etanol 70% e inverter os tubos várias vezes para lavar o *pellet* de DNA.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Descartar o etanol por inversão.
8. Secar o tubo sobre papel absorvente durante 15 minutos.

Hidratação do DNA

1. Adicionar 20 μ L de água ultrapura autoclavada.
2. Armazenar a -20°C .

Anexo IV: Protocolo da Mistura dos Reagentes para PCR e Termociclagens

REAÇÃO DE PCR – Amplificação de um segmento do gene GAPDH

Reagentes / Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para uma reação
Tampão 10 x	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,0 mM	2,0 µl
dNTP's (2mM)	0,2 mM	2,5 µl
Taqpol	0,25 U	0,5 µl
Primer 1 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
Primer 2 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
DNA (100ng)	2ng/µl	2,0 µl
Água ultra pura (q.s.p 25 µl)	-	13,5 µl
Volume total	25µl	25,0 µl

Condições de Ciclagem :

95°C	- 5 min	
95°C	- 30 sec	} 40 ciclos
59°C	- 60 sec	
72°C	- 60 sec	
72°C	- 7 min	
4°C	- ∞	

REAÇÃO DE PCR – Detecção de HPV com primers SPF 1/2

Reagentes / Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para uma reação
Tampão 10 x	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	2,5 mM	1,25 µl
dNTP's (2mM)	0,2 mM	2,5 µl
Taqpol	0,25 U	0,5 µl
Primer 1 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
Primer 2 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
DNA (100ng)	2ng/µl	2,0 µl
Água ultra pura (q.s.p 25 µl)	-	15,25 µl
Volume total	25µl	25,0 µl

Condições de Ciclagem :

94°C	- 1 min	} 40 ciclos
94°C	- 1 min	
45°C	- 1 min	
72°C	- 1 min	
72°C	- 5 min	
4°C	- ∞	

REAÇÃO DE PCR – Detecção do HPV16

Reagentes / Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para uma reação
Tampão 10 x	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	2,5 mM	1,25 µl
dNTP's (2mM)	0,2 mM	2,5 µl
Taqpol	0,25 U	0,5 µl
Primer 1 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
Primer 2 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
DNA (100ng)	2ng/µl	2,0 µl
Água ultra pura (q.s.p 25 µl)	-	14,25 µl
Volume total	25µl	25,0 µl

Condições de Ciclagem :

94°C	- 1 min	} 40 ciclos
94°C	- 1 min	
45°C	- 1 min	
72°C	- 1 min	
72°C	- 5 min	
4°C	- ∞	

REAÇÃO DE PCR – Detecção do HPV18

Reagentes / Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para uma reação
Tampão 10 x	1X	3,0 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	0,75 µl
dNTP's (2mM)	0,2 mM	3,0 µl
Taqpol	1,25 U	0,6 µl
Primer 1 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
Primer 2 (2,5µM)	0,1 µM	1,0 µl
DNA (100ng)	2ng/µl	5,0 µl
Água ultra pura (q.s.p 25 µl)	-	10,65 µl
Volume total	25µl	25,0 µl

Condições de Ciclagem :

94°C	- 3 min	
94°C	- 1 min	} 35 ciclos
53°C	- 1 min	
72°C	- 1 min	
72°C	- 3 min	
4°C	- ∞	

Anexo IV – Protocolos de Confecção do Gel, do Tampão de Amostra e de Coloração

Gel de Poliacrilamida 8% Não Desnaturante

Reagentes	Volume
Água deionizada	24 mL
Acrilamida 40%	7 mL
TBE 10x	3,5 mL
Persulfato de Amônio 10%	350 µL
TEMED	35 µL
Volume Final	35 mL

Tampão de Amostra

Reagentes	Volume
Água deionizada	7 mL
Glicerol	3 mL
Azul de bromofenol	0,025 g
Xileno cianol	0,025 g

Coloração com Nitrato de Prata

Solução de fixação:

50 mL de etanol 100%

2 mL de ácido acético

Água deionizada q.s.p. 300 mL

Utilizar 150 mL da solução junto com 2 mL de nitrato de prata para corar o gel.

Utilizar o restante após a solução de revelação para fixar a coloração.

Solução de revelação

15 mL de hidróxido de sódio 30%

2 mL de formaldeído 37%

Água deionizada q.s.p. 200 mL.