

**Universidade Federal do Rio Grande do sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
LESÕES VULVARES SEGUNDO AS VIAS CARCINOGENICAS**

Raquel Camara Rivero

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Co-orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Kliemann

Porto Alegre

2013

DEDICATÓRIA

À minha família, que tem o dom de sempre estar presente em todos os momentos, permitindo e apoiando mais esse passo.

Aos meus pais, pela força, apoio, amizade e amor constantes e inabaláveis.

Ao meu querido marido, por ser, há tantos anos, a inspiração e o porto seguro que me permitem seguir viagem.

À minha doce filhinha Isadora, pois tudo que faço é, desde sempre, dedicado especialmente a ela, com todo amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Edison Capp, pela oportunidade única de trabalhar com um pesquisador de excelência, que sempre me fez buscar o melhor, com determinação e irretocável espírito científico.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Lúcia Kliemann, pela presença constante e inabalável, pelo exemplo de dedicação, competência e comprometimento. Muito obrigada por ser a mão segura que me guiou por todo o caminho. Certamente esse trabalho não seria possível sem a sua força.

Ao Dr. Luciano Hammes, idealizador desse projeto. Um colega admirável, exemplo de competência.

À bolsista Déborah Garcia, que, com a excelência e dedicação que lhe são características, realizou importante pesquisa de prontuários.

À querida Flavinha do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA pelo trabalho dedicado, pela amizade de tantos anos e pela alegria sempre presente.

Aos estimados colegas Prof. Dr. Rafael Brighenti e Dr. Pedro Guilherme Schaefer, competentes patologistas, pelo coleguismo e apoio.

Às queridas amigas Alexandra, Francine, Juliana e Liane, que, além de excelentes patologistas, são pessoas maravilhosas que tornam tudo melhor e mais leve.

Ao FIPE, ao PPGCM, ao HCPA e a todos os colegas Serviço de Patologia.

Finalmente, a todas as pacientes que anonimamente colaboraram com um pouco de suas vidas para que esse trabalho pudesse ser realizado.

*A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas
paisagens, mas em ter novos olhos.*

Marcel Proust

RESUMO

Introdução: o carcinoma epidermoide invasor (CE) de vulva é uma doença rara, que corresponde a cerca de 3-5% dos tumores malignos do trato genital feminino e a 90% de todas as neoplasias malignas primárias da vulva. Existem duas vias para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais (NIV) e CE vulvar: uma via não relacionada ao papilomavírus humano (HPV) e outra relacionada ao HPV, com características clínicas, patológicas e epidemiológicas distintas. **Objetivos:** estudar as duas vias da carcinogênese vulvar, realizando correlação da expressão imuno-histoquímica do p53 com a histologia. **Métodos:** foi realizado estudo do tipo caso-controle com 76 casos. Esses foram reclassificados conforme a terminologia da Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD, 2004), tendo sido realizada imuno-histoquímica para p53 e revisão de dados clínicos. **Resultados:** foram identificados 26 casos normais, 15 casos da via associada ao HPV (12 de NIV usual; 3 de CE condilomatoso) e 13 da via não associada ao HPV (5 de NIV diferenciada; 8 de CE queratinizante). A expressão do p53 nas vias carcinogênicas apresentou diferenças significativas: na via não associada ao HPV o p53 apresentou maior percentagem de células coradas (>25%, $p < 0,001$), padrão basal com extensão ao terço médio para as NIV diferenciadas e difuso ou infiltrativo para os CE ($p < 0,001$). A via carcinogênica associada ao HPV apresentou marcação de p53 menos extensa (até 10% das células, $p < 0,001$), com padrão basal para as NIV usuais, sendo negativo para p53 nos CE condilomatosos ($p < 0,001$). Encontramos diferenças entre as idades ($p < 0,05$), sendo que as pacientes da via não associada ao HPV apresentaram média de 66 anos e as da via associada, média de 44 anos. **Conclusão:** existe um padrão característico, baseado na histologia e expressão do p53, que separa as lesões vulvares em duas vias carcinogênicas distintas. O uso rotineiro de imuno-histoquímica para o p53 simultânea ao diagnóstico histológico em todos os casos de NIV e CE vulvar poderá auxiliar na definição da via carcinogênica, permitindo um melhor acompanhamento clínico das pacientes.

Palavras-chave: carcinoma epidermoide vulvar, neoplasia intraepitelial vulvar, papilomavírus humano, p53, carcinogênese vulvar, imuno-histoquímica

ABSTRACT

Introduction: The squamous cell carcinoma of the vulva is a rare disease, which accounts for about 3-5 % of malignant tumors of the female genital tract and 90 % of all primary neoplasms of the vulva. There are two pathways for the development of intraepithelial neoplasia (VIN) and vulvar squamous cell carcinoma: a pathway unrelated to human papillomavirus (HPV) and other HPV-related, with significant differences in clinical, pathological and epidemiological aspects. **Objectives:** To study the two pathways of vulvar carcinogenesis, correlating the results of p53 with histology. **Methods:** A retrospective case-control with 76 cases. These were reclassified according to the terminology of the International Society for the Study of Vulvar Diseases (ISSVD, 2004). Was performed immunohistochemistry for p53 and review of clinical data. **Results:** We identified 26 normal cases, 15 cases of HPV-related pathway (12 usual VIN; 3 warty squamous carcinoma) and 13 not related with HPV (5 differentiated VIN; 8 keratinizing squamous cell carcinoma). The p53 showed significant differences: in cases related to HPV p53 showed a higher percentage of stained cells ($> 25\%$, $p < 0.001$), basal pattern extending to the middle third to the differentiated VIN and diffuse or infiltrative for keratinizing carcinoma ($p < 0.001$). The p53 in HPV-related cases was less extensive (up to 10 % of the cells, $p < 0.001$), with a basal pattern for usual VIN and negative pattern for warty carcinoma ($p < 0.001$). We found significant differences between age groups, with the group of patients with HPV-related average of 44 years and the patients in the group unrelated to HPV average of 66 years. **Conclusion:** There is a characteristic pattern, based on the results of histology and p53, which separates the vulvar lesions in two distinct carcinogenic pathways. We propose the routine use of p53 simultaneously to histological diagnosis in all cases of VIN and vulvar squamous cell carcinoma, as this would assist in defining the carcinogenic pathway allowing better monitoring of the patient.

Keywords: squamous vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, humanpapillomavirus, p53, vulvar carcinogenesis, immunohistochemistry

LISTA DE ABREVIATURAS

- CE: Carcinoma epidermoide invasor
- DNA: *Desoxiribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)
- E6: *Early protein 6* (proteína precoce 6)
- E7: *Early protein 7* (proteína precoce 7)
- G1: *Gap 1* (intervalo 1)
- G2: *Gap 2* (intervalo 2)
- HE: Hematoxilina e eosina
- HIV: *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- HPV: *Human papillomavirus* (papilomavírus humano)
- IHQ: Imuno-histoquímica
- ISSVD: *The International Society for the Study of Vulvovaginal Disease* (Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares)
- NIV: Neoplasia intraepitelial vulvar (NIVs: neoplasias intraepiteliais vulvares)
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PCR: *polymerase chain reaction*
- pRB: *protein retinoblastoma* (proteína retinoblastoma)
- p16: *protein p16^{INK4a}* (proteína p16^{INK4a})
- p53: *protein 53* (proteína 53)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Carcinogênese vulvar	10
2.1.1 Via carcinogênica associada ao HPV	11
2.1.2 Via carcinogênica não associada ao HPV	11
2.2 Lesões precursoras do carcinoma epidermoide – aspectos gerais	12
2.2.1 Líquen escleroso	13
2.2.2 NIV usual	15
2.2.3 NIV diferenciada	17
2.3 Carcinoma epidermoide invasor	18
2.3.1 Padrões histológicos mais comuns do carcinoma epidermoide invasor ...	19
2.4 p53	20
2.4.1 Aspectos gerais	20
2.4.2 Imuno-histoquímica do p53 na patologia vulvar neoplásica	21
2.5 Aspectos intrigantes da carcinogênese vulvar	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos gerais	25
3.2 Objetivos específicos	25
5. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	33
6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide invasor (CE) de vulva é uma doença rara, que corresponde a cerca de 3-5% dos tumores malignos do trato genital feminino e a 90% de todas as neoplasias primárias da vulva (1).

De acordo com C. Bodelon et al., a incidência de câncer de vulva vem aumentando nos EUA nas últimas três décadas. Entre 1973 e 2004, a incidência de neoplasias vulvares *“in situ”* aumentou 3,5% ao ano, enquanto a incidência de lesões invasoras aumentou 1,0% ao ano (2). Estudo populacional realizado na Dinamarca avaliou a incidência de carcinoma epidermoide invasor e neoplasia *“in situ”* de vulva entre 1978 e 2007. Foi identificado aumento da incidência tanto das lesões precursoras quanto de lesão invasora, o que pode ser explicado pelo aumento da taxa de infecção pelo papilomavírus humano (HPV) na população (3). Estudo epidemiológico realizado na Alemanha sobre incidência de cânceres de vagina e vulva identificou aumento dos casos do câncer de vulva desde a década de 70. A idade média ao diagnóstico foi de 72 anos. As pacientes com diagnóstico antes dos 50 anos apresentavam neoplasias associadas ao HPV, com concomitância de câncer do colo uterino e câncer anal em 20% dos casos (4).

A incidência do carcinoma epidermoide de vulva no Brasil é uma das mais altas do mundo e Porto Alegre (RS), Goiânia (GO) e Recife (PE) são as capitais brasileiras com maior número de novos casos (1).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinogênese vulvar

A carcinogênese vulvar não é tão diretamente associada ao HPV quanto a carcinogênese do colo uterino (5). No colo uterino cerca de 100% dos carcinomas epidermóides são associados ao HPV (6), enquanto na vulva, cerca de 40% dos carcinomas epidermóides apresentam essa associação (7,8).

Na vulva, alterações epiteliais são encontradas adjacentes ao carcinoma epidermoide em 50-70% das pacientes. A maioria dessas alterações epiteliais apresenta algum grau de displasia. É amplamente aceito que a maioria dos carcinomas epidermóides de vulva se origina em lesões intraepiteliais, denominadas neoplasias intraepiteliais vulvares (NIVs). Essas precedem o surgimento do carcinoma invasor por período variável de tempo (9).

Fortes evidências acumuladas demonstram que existem duas vias etiopatogênicas diferentes para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais vulvares e de CE vulvar: uma via não relacionada ao HPV e outra relacionada ao HPV (10,11). Essas duas vias apresentam diferentes características clínicas, patológicas e epidemiológicas, devendo ser consideradas duas entidades distintas (9,12). A primeira e mais comum, não associada ao HPV, ocorre em mulheres mais velhas e leva principalmente ao carcinoma epidermoide do tipo queratinizante, frequentemente em um “background” de líquen escleroso e neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) diferenciada (5,10,11). A segunda via, associada ao HPV, ocorre em mulheres mais jovens e está associada à NIV basaloide ou condilomatosa (“warty”), também chamada de NIV usual, e leva aos carcinomas epidermóides dos tipos condilomatoso e basaloide (5,10,11).

2.1.1 Via carcinogênica associada ao HPV

O HPV tem sido identificado em um subgrupo de carcinomas epidermóides invasores vulvares, sugerindo uma relação causal (5). Em revisão da literatura realizada por Nieuwenhof et al.(5), foram avaliados dezesseis estudos envolvendo um total de 1181 casos de carcinoma vulvar, encontrando-se em média 35% de positividade total para HPV, com 25% de positividade para HPV dos tipos 16 e 18.

Metanálise publicada por De Vuyst et al. (7) avaliou a presença de HPV detectado por PCR (polymerase chain reaction), estratificada por região geográfica, concluindo que o tipo mais comum de HPV detectado foi o HPV 16, presente em 71,9% das NIVs usuais de alto grau e em 32% dos CE de vulva. Além disso, foi encontrada uma taxa de positividade maior para HPV nos Estados Unidos (63,2%) do que na Europa (34,7%). A positividade para HPV está mais associada a CE basalóides/condilomatosos do que queratinizantes. A prevalência geral foi de 40% nos CE vulvares e 85,3% nas lesões intraepiteliais de alto grau. Os achados dessa metanálise corroboram a ideia já comentada anteriormente de que existem duas vias distintas para carcinogênese vulvar (7,13).

Na via relacionada ao HPV, o CE é precedido pela NIV usual (10,11). Esses casos compreendem cerca de 40% das neoplasias invasoras, ocorrem em pacientes mais jovens, estão mais associados à multifocalidade e à concomitância de lesões no colo uterino. Apresentam integração do genoma viral, com amplificação 3p25-27 (12). A maioria CE é positiva para HPV16, sendo que quase todos os tumores restantes são positivos para HPV18 e HPV33 (12). Os HPV dos tipos 16 e 18 pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus* e apresentam tropismo pelas mucosas. O tabagismo é fator de risco para desenvolvimento de lesões neoplásicas associadas ao HPV, provavelmente por um mecanismo relacionado à imunossupressão (14).

2.1.2 Via carcinogênica não associada ao HPV

Nessa via o CE é precedido pela NIV diferenciada. Não há correlação com infecção pelo HPV, nem risco aumentado de neoplasias do colo uterino. Esses casos estão associados à história prévia de líquen escleroso e ocorrem em

pacientes mais velhas (3). Essa rota origina carcinomas epidermóides queratinizantes bem diferenciados, semelhantes histologicamente aos carcinomas epidermóides convencionais da pele não-genital (12).

2.2 Lesões precursoras do carcinoma epidermoide – aspectos gerais

As áreas adjacentes ao CE apresentam lesões intraepiteliais em 50 a 70% dos pacientes. Essas lesões intraepiteliais (NIVs) apresentam algum grau de displasia e precedem os carcinomas invasores por um período de tempo variável (15).

O diagnóstico de NIV é histológico, sendo necessária a realização da biópsia, já que não existem sinais ou sintomas específicos (16). O epitélio escamoso vulvar sofre ações de diversos agentes, tais como urina, secreções vaginais, traumas por produtos químicos de higiene ou peças de vestuário. O sintoma mais comum de NIV é o prurido, que ocorre em cerca de 59% das pacientes (17).

O primeiro autor a descrever lesões escamosas intraepiteliais foi Bowen em 1912, motivo pelo qual elas foram denominadas inicialmente doença de Bowen. Desde então, numerosos termos e nomenclaturas foram empregados para classificar as lesões precursoras do carcinoma epidermoide de vulva. A Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD) simplificou a terminologia para carcinoma “*in situ*” e atipia vulvar em 1976. Em 1986 a ISSVD adotou o termo NIV, que foi dividida em 3 graus, NIV 1, 2 e 3, baseada na terminologia utilizada para as lesões displásicas intraepiteliais do colo uterino. Mais recentemente, em 2003, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as lesões num sistema de 3 graus para os tipos condilomatoso (“warty”)/basaloide e *simplex* (18–20).

A ISSVD adotou em 2004 a classificação das NIVs em dois tipos: NIV usual e NIV diferenciada. A ISSVD decidiu abolir o termo NIV 1. O termo NIV só é aplicado a lesões de alto grau antes denominadas NIVs 2 e 3 e para NIV diferenciada. Essa mudança foi feita baseada na observação de que as lesões chamadas de NIV 1, 2 e 3 não representavam um *continuum* biológico, já que a lesão chamada NIV 1 não é precursora de câncer invasor (18).

Quadro 1. Classificação das neoplasias epiteliais vulvares (8)

OMS (2003)

- NIV 1, 2 e 3 (tipos “warty” e basaloide)
- NIV 1, 2 e 3 (tipo *simplex*)

ISSVD (2004)

- NIV, tipo usual ou clássico (NIV 2, 3)
 - (a) Tipo condilomatoso (“warty”)
 - (b) Tipo basaloide
 - (c) Tipo misto
- NIV, tipo diferenciado (NIV 3)

2.2.1 Líquen escleroso

O líquen escleroso também foi sugerido como precursor de uma via de surgimento de carcinoma epidermoide independente do HPV, porém mecanismo dessa progressão carcinogênica ainda não está totalmente esclarecido. O líquen escleroso é frequentemente encontrado nas áreas adjacentes ao carcinoma epidermoide invasor. Além disso, alguns estudos de coorte demonstraram que mulheres com líquen escleroso têm maior risco de desenvolver carcinoma epidermoide, porém a maioria das pacientes essa doença não desenvolve carcinoma epidermoide (15).

O líquen escleroso é uma doença mucocutânea inflamatória crônica com especial preferência pela área genital, mas que pode ocorrer em qualquer parte do corpo. Essa doença também foi conhecida como craurose vulvar, leucoplasia e líquen escleroso e atrófico. Em 1976 a ISSVD recomendou o termo líquen escleroso para unificar todos os demais. O líquen escleroso tem sido relatado em todas as faixas etárias (21), apresenta pico de incidência bimodal em meninas pré-púberes e mulheres pós-menopáusicas (22) e afeta entre 1 em 300 e 1 em 1000 indivíduos na

população (23). Manifesta-se inicialmente como uma placa eritematosa que pode evoluir para lesão brancacenta e endurecida (21), podendo ocorrer teleangiectasias, fissuras, erosão e ulceração. Pode ser assintomático ou associado a prurido e queimação local (24). A etiologia exata é desconhecida, mas fatores imunológicos, genéticos, hormonais, infecciosos e trauma têm sido envolvidos (21).

Os achados histológicos dependem da fase da doença no momento da biópsia. A apresentação típica é de epitélio hiperqueratótico (se a paciente tende a coçar a lesão) ou epitélio atrófico, com degeneração hidrópica da camada basal, leve espongirose, colágeno subepidérmico esclerótico e infiltrado linfocitário dérmico. As artérias e arteríolas da derme superior apresentam sinais de endarterite obliterante (25). Existem, porém, numerosas variações desses aspectos histológicos clássicos previamente descritos, de forma que o líquen escleroso pode apresentar diversos aspectos histológicos (26).

Entre as complicações que podem ocorrer no líquen escleroso de longa duração está o carcinoma epidermoide, com risco estimado nas mulheres de 2 a 6% (27–29). Estudos histológicos cuidadosos de pacientes com carcinoma epidermoide revelaram líquen escleroso adjacente em 60% dos casos (30). Evidências sugerem que o líquen escleroso é um fator carcinogênico HPV independente (24,31–33). O exato mecanismo carcinogênico ainda está em debate, sendo que o processo inflamatório crônico associado ao líquen escleroso poderia levar a anormalidades moleculares que facilitariam a transformação neoplásica (24). A alta expressão de p53 nas camadas basais do líquen escleroso tem sido postulada como marcador para aumento da probabilidade de progressão para carcinoma epidermoide vulvar (29). Porém, até o momento, nenhum marcador molecular se mostrou eficiente para identificar os casos de líquen escleroso que têm risco de evoluir para carcinoma epidermoide (26).

Em trabalho publicado em 2011, Nieuwenhof et al. demonstrou, após revisão, que boa parte dos exames anatomopatológicos diagnosticados previamente como líquen escleroso deveriam ser diagnosticados como NIV diferenciada (26).

2.2.2 NIV usual

Essas lesões são chamadas de NIV usual (“not otherwise specified”) pela ISSVD. Esse grupo está associado ao HPV: a presença de HPV 16 é detectada em cerca de 70% dos casos (34). Essas lesões correspondem histologicamente às lesões escamosas intraepiteliais de alto grau encontradas no colo uterino, região anal, vagina e pênis, ou seja, aquelas em que a displasia ocupa dois terços ou toda espessura do epitélio (7,15). Nas últimas décadas a NIV usual tem sido diagnosticada em pacientes mais jovens (cerca de 40 anos). Fatores de risco para NIV usual incluem: tabagismo (60-80 %), história de condilomas acuminados, herpes genital e infecção pelo vírus do HIV. O envolvimento multifocal da vulva ocorre em mais de 40% dos casos e essa NIV está associada à doença intraepitelial multicêntrica de colo uterino ou vagina (34).

Essas lesões são o protótipo da NIV, sendo facilmente reconhecidas histologicamente pelas óbvias anormalidades arquiteturais e citológicas (15). A epiderme se encontra espessada, com frequentes hiperqueratose e parakeratose atípica. Há perda da maturação celular, com atipia nuclear em todas as camadas do epitélio. Identifica-se aumento da relação núcleo-citoplasmática, hiperqueratose nuclear, pleomorfismo, multinucleação e numerosas figuras mitóticas, incluindo mitoses atípicas. Atipias coilocíticas podem estar ou não presentes. Células apoptóticas com denso citoplasma eosinofílico e núcleos picnóticos são comuns. Envolvimento do epitélio folicular dos anexos cutâneos por células atípicas e numerosos melanófagos no derma papilar também são característicos (15,34,35).

As NIVs usuais podem ser divididas histologicamente nos tipos condilomatoso (“warty”) e basaloide/indiferenciada (“bowenoid”) (15,35). A NIV usual basaloide apresenta células indiferenciadas (que lembram as células basais) comprometendo toda espessura da epiderme, que normalmente é plana, não-papilomatosa. A NIV usual condilomatosa apresenta cones interpapilares largos e profundos, resultando na aparência condilomatosa característica. Além da acantose, são comuns evidências citológicas de infecção viral, tais como alterações coilocíticas, multinucleação e grânulos grosseiros de queratina (15).

Existe, porém, frequente sobreposição entre esses dois padrões, sendo que a mistura dos padrões basaloide e condilomatoso é comumente encontrada na mesma lesão. Assim, os dois subtipos são considerados variantes histológicas da mesma lesão, em vez de duas entidades separadas (15,35,36).

No sistema de graduação proposto pela OMS, a NIV usual é denominada NIV clássica e é dividida em três categorias, NIV1, NIV2 e NIV3, semelhante à divisão realizada para as lesões intraepiteliais do colo uterino. Entretanto, lesões planas de baixo grau com maturação superficial e atipia coilocítica (NIV 1) são raras na vulva, apesar de frequentes no colo uterino. Lesões vulvares mostrando claras alterações citológicas relacionadas ao HPV e displasia de baixo grau são os típicos condilomas acuminados (exofíticos) vulvares e assim devem ser diagnosticados. Os condilomas acuminados não devem ser diagnosticados como NIV 1, pois representam infecções por subtipos virais de HPV de baixo-risco (HPV6 e HPV11), que muito raramente, ou nunca, progredem para carcinoma epidermoide vulvar (15,37). Além disso, a grande subjetividade na diferenciação entre NIV 2 e NIV 3 levou à unificação dessas duas categorias na NIV usual, de acordo com a ISSVD. O diagnóstico de papulose bowenoide é considerado um termo antigo e não deve ser mais utilizado, já que essa lesão é indistinguível da NIV usual, devendo ser diagnosticada como tal (15).

O diagnóstico diferencial entre NIV usual e CE inicial pode ser difícil. Características sugestivas de invasão inicial são irregularidade no tamanho e forma dos ninhos epiteliais, células invasoras com citoplasma eosinofílico e a presença de estroma desmoplásico (38). Cortes oblíquos de NIV usual podem demonstrar ilhas de células atípicas na derme, destacadas da epiderme, simulando invasão. Porém, em contraste com ilhas verdadeiramente invasivas, essas têm contornos lisos, aspecto bulboso e não é identificada desmoplasia (15).

Em geral, o potencial de malignidade da NIV usual é considerado baixo em comparação à NIV diferenciada. Em contraste com a progressão para carcinoma invasor, também foi descrita regressão espontânea da NIV usual, provavelmente relacionada a uma melhora do estado imune da paciente (22).

2.2.3 NIV diferenciada

A NIV diferenciada foi descrita inicialmente nos anos 60 como uma forma altamente diferenciada de carcinoma “*in situ*” e designada como carcinoma intraepitelial do tipo simplex. Em 1977 o termo “diferenciada” foi introduzido para ressaltar as características morfológicas altamente diferenciadas dessa entidade (22).

Não associada ao HPV, menos comum que a NIV usual, compreendendo entre 2 a 5% dos casos de NIV, essa lesão (10) acomete mulheres em faixa etária mais avançada que a NIV usual, com média de 67 anos (22), e está menos associada ao tabagismo (25%). O envolvimento multifocal e multicêntrico de vagina e colo é raro (18), a lesão geralmente é unifocal e a quantidade de pele envolvida é limitada (11). O potencial de progressão para carcinoma epidermoide invasor da NIV diferenciada parece ser maior do que o da NIV usual (18) e ela é caracterizada como uma lesão altamente proliferativa, de rápida evolução (11). Isso se justifica pelo fato dessa lesão ser frequentemente diagnosticada adjacente a carcinoma epidermoide queratinizante HPV negativo e raramente diagnosticada sem estar associada ao mesmo (39,40). O carcinoma epidermoide queratinizante não associado ao HPV é de três a quatro vezes mais comum que os carcinomas epidermóides associados ao HPV (18).

A NIV diferenciada, ao contrário da NIV usual que é bem documentada, tem recebido pouca atenção, pois apresenta dificuldade diagnóstica (40). Pode ser difícil distingui-la histologicamente de uma lesão vulvar benigna (como por exemplo, dermatite crônica ou hiperplasia de células escamosas) ou até mesmo de epitélio normal (39,40). Além disso, o tempo curto de progressão da NIV diferenciada para carcinoma epidermoide (mais curto do que o da NIV usual) contribui para sua raridade diagnóstica (18,41). Muitos casos são identificados retrospectivamente, junto às margens de CE queratinizantes, frequentemente em continuidade com líquen escleroso (18).

A NIV diferenciada apresenta características histológicas muito mais sutis do que as descritas para NIV usual. O principal achado da NIV diferenciada é a presença de queratinócitos atípicos anormais em um epitélio vulvar totalmente

diferenciado (15). Histologicamente identifica-se atipia citológica na camada basal, caracterizada por hiper Cromasia leve e hiper celularidade, acantose, alongamento e anastomose dos cones interpapilares, falha de maturação e espongirose (26). Observa-se hiper ceratose, paraceratose e pontes celulares proeminentes. A maior parte da epiderme é constituída por queratinócitos anormais, aumentados, com núcleo vesicular e macronúcleo. O citoplasma é abundante e eosinofílico, com formação de pérolas de queratina nos cones interpapilares (15,26). O diagnóstico diferencial histológico inclui psoríase, dermatite espongiótica e vulvite por cândida (34).

As pacientes com NIV diferenciada podem ter líquen escleroso associado, especialmente aquelas que também desenvolveram CE (15).

Já que a lesão na maioria das vezes é unifocal, ao contrário da NIV usual, que geralmente é multicêntrica, a ampla excisão local provavelmente reduz o risco de progressão para CE (11).

2.3 Carcinoma epidermoide invasor

Os carcinomas epidermoides invasores, da mesma forma que as lesões precursoras, também podem ocorrer por duas diferentes vias (11,12,18,34).

Carcinomas epidermoides invasores vulvares associados a HPV oncogênicos mucosos tendem a ocorrer em pacientes mais jovens. Geralmente pertencem aos subtipos histológicos condilomatoso (“warty”) ou basalóide e se desenvolvem a partir de uma lesão “*in situ*” bem caracterizada, do tipo NIV usual (12). As lesões muitas vezes são multifocais. Cerca de um terço dos CE vulvares estão associados ao HPV (11).

Os CE não associados ao HPV geralmente ocorrem em mulheres mais velhas (11,12). Esses tumores estão associados a um “*background*” de líquen escleroso ou dermatoses inflamatórias (11,34). Nesses casos a lesão precursora é a NIV diferenciada, que, como discutido anteriormente, pode ser difícil de diferenciar

histologicamente tanto de uma lesão benigna (por exemplo, lesão de natureza inflamatória) quanto de epitélio normal.

Os CE em geral caracterizam-se, histologicamente, por apresentarem invasão da membrana basal, com crescimento epitelial irregular no estroma, desmoplasia, perda da polaridade celular e invasão de espaços angiolímfáticos (34). As pacientes podem apresentar lesão vulvar pruriginosa, dolorosa ou associada a sangramento e, ocasionalmente, com massa inguinal (18).

2.3.1 Padrões histológicos mais comuns do carcinoma epidermoide invasor

- **Carcinoma epidermoide invasor basaloide:** associado ao HPV, apresenta células com alta relação núcleo-citoplasmática lembrando as células basais do epitélio, crescimento coeso, lençóis interconectantes de células tumorais, maturação variável, pouca queratinização e pseudo-coilocitose (15,34).
- **Carcinoma epidermoide invasor condilomatoso (“warty”):** associado ao HPV, exhibe ninhos celulares bulbosos ou irregulares, frequente queratinização e alterações coilocíticas proeminentes (15).
- **Carcinoma epidermoide invasor queratinizante:** frequentemente associado à NIV diferenciada e líquen escleroso, não associado ao HPV. Apresenta maturação e queratinização importantes, pérolas de queratina e ausência de alterações coilocíticas (15).

De acordo com Del Pino et al. foi demonstrado que pode existir alguma sobreposição entre os tipos histológicos e a associação com HPV, sendo que a presença de NIV diferenciada ou líquen escleroso na periferia de tumor é uma forte evidência de sua natureza independente do HPV, enquanto o achado de NIV usual favorece via associada ao HPV (15).

Existem outros tipos raros de CE relatados, tais como acantolítico, de células fusiformes sarcomatoso ou com reação fibromixoide estromal proeminente. De acordo com Del Pino et al. (15), todas essas variantes são HPV negativas. Da mesma forma, o carcinoma verrucoso, que inicialmente parecia estar associado a HPV de baixo risco, recentemente foi demonstrado como não associado ao HPV.

2.4 p53

2.4.1 Aspectos gerais

Inúmeros biomarcadores estão sendo estudados no trato genital feminino, não só em vulva, mas também em colo e vagina. Dentre eles, estudos têm demonstrado um potencial uso p53 para a identificação e classificação de NIVs e carcinomas epidermóides vulvares (1).

A alteração genética mais comum relacionada ao câncer em humanos é a mutação do gene supressor de tumores p53 (42). O p53 é uma peça chave na manutenção da integridade genômica (28), sendo responsável por reconhecer danos ao DNA e parar o ciclo celular nas fases G1 ou G2 para permitir que o reparo ao DNA aconteça. Em estados em que a célula não está exposta a estresse, a proteína p53 é mantida em níveis basais baixos, exercendo poucas funções. Entretanto, em resposta a estresse, a ativação do p53 leva a aumento dos níveis de proteínas e das capacidades bioquímicas da célula. A ativação o p53 leva a alterações fenotípicas que podem variar do aumento do reparo no DNA, à senescência e apoptose (43). A inibição da síntese de DNA em replicação após detecção de dano é fundamental para evitar perpetuação de lesões genéticas (44). A inativação do p53 é um importante evento celular durante a carcinogênese (45). Existem diferentes mecanismos moleculares que levam à inativação do p53.

Infecção persistente com HPV de alto risco e integração do DNA do HPV ao genoma da célula tem sido relacionada à etiologia das patologias pré-malignas e malignas do trato genital inferior (46). As NIVs usuais e os carcinomas epidermóides invasores dos tipos condilomatoso e basalóide são positivos para HPV em torno de 80% dos casos testados por PCR. Em contraste, os carcinomas epidermóides vulvares queratinizantes convencionais apresentam positividade para HPV em apenas 13 a 16% dos casos (47). Os HPV associados a cânceres anogenitais codificam duas oncoproteínas, E6 e E7. Ambas formam ligações específicas a proteínas reguladoras do hospedeiro. Produtos virais E6 e E7 interferem com duas vias de regulação do ciclo celular. A oncoproteína E7 se liga ao produto do gene supressor de tumor do retinoblastoma (pRB), com preferência pela forma ativa (não-

fosforilada) do mesmo. As oncoproteínas E7 dos HPV de alto risco ligam-se ao pRB com mais afinidade do que as oncoproteínas E7 dos HPV de baixo risco. HPV E7 inativa o pRB, o que resulta em superexpressão de p16^{INK4a} e hiperproliferação celular (40). A oncoproteína E6 dos HPV de alto risco liga-se ao p53, levando a uma disfunção do mesmo e interferindo na interrupção do ciclo celular (11). Essa interação leva à supressão do p53 “in vitro”, o que provavelmente causa a baixa detecção do p53 em carcinomas de colo uterino. Células infectadas por HPV têm níveis baixos de proteína p53 (48). Assim sendo, as oncoproteínas virais E6 e E7 têm um papel importante na carcinogênese.

Outro mecanismo envolvido na carcinogênese é a mutação do p53 que funciona como “mutação dominante negativa”. A codificação com superexpressão dos polipeptídeos mutantes compromete a atividade do gene selvagem, inativando-o (49). Frequentemente as mutações têm potencial oncogênico e meia-vida mais longa, resultando em acúmulo de p53 em células tumorais. O nível de p53 em células não transformadas é baixo e a meia-vida da proteína é curta (6 a 30 minutos). O aumento do nível de p53 está relacionado à perda do controle do crescimento e imortalização celulares (50). A superexpressão imuno-histoquímica de p53 é sinônimo de mutação, mas nem todas as mutações levam a uma superexpressão do p53. Nesses casos, uma deleção de função pode ser o mecanismo inicial, em vez de mutação dominante negativa (51).

Mutações nos genes pRB e p53 são detectadas em linhagens de células de carcinoma de colo uterino HPV negativas, mas não em linhagens de células HPV positivas (52).

2.4.2 Imuno-histoquímica do p53 na patologia vulvar neoplásica

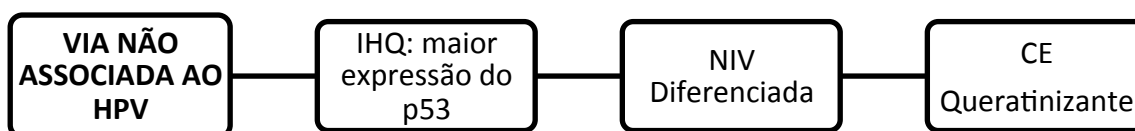
De acordo com Van der Avoort et al. (29) a alta expressão imuno-histoquímica de p53 se correlaciona com a presença de DNA aneuploide em lesões vulvares. A aneuploidia do DNA, segundo o mesmo autor, pode ocorrer nos estágios iniciais de transformação maligna.

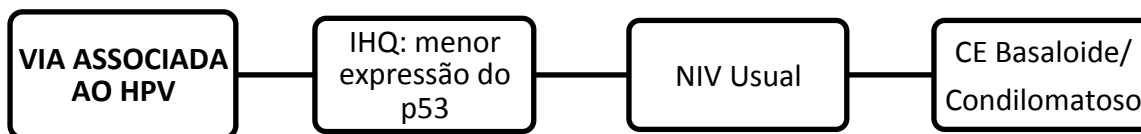
O anticorpo imuno-histoquímico anti-p53 reage tanto com o tipo selvagem quanto com as formas mutantes da proteína p53 (53). Assim, é esperada uma baixa

marcação de p53 no epitélio vulvar normal. Nos casos em que não há marcação do p53 pode haver mutações negativas (“null mutations”) verdadeiras ou a mais rápida degradação do p53 pela ligação à proteína E6 do HPV (53).

Nos carcinomas epidermóides vulvares, a mutação com superexpressão do p53 está relacionada diretamente ao tipo queratinizante (54) e inversamente aos tipos basaloide e condilomatoso (55). A via carcinogênica não associada ao HPV apresenta positividade do p53 (3). Em exame imuno-histoquímico, o p53 frequentemente apresenta expressão aumentada nas NIVs diferenciadas e carcinomas epidermóides queratinizantes devido a acúmulos celulares da proteína p53 mutada (11). De acordo com Van de Avoort et al. (29) a marcação imuno-histoquímica do p53 na NIV diferenciada tem uma percentagem média de cerca de 50% das células positivas, localizada no terço inferior do epitélio com extensão suprabasal. No líquen escleroso, por sua vez, a percentagem de células positivas não ultrapassa 30%. A via carcinogênica associada ao HPV (NIV usual) é negativa para p53. Assim, a avaliação da expressão imuno-histoquímica do p53 poderia ser útil para aumentar a detecção e auxiliar na confirmação do diagnóstico de NIV diferenciada (11,56).

Figura 2. Marco conceitual esquemático da carcinogênese vulvar





2.5 Aspectos intrigantes da carcinogênese vulvar

É paradoxal o fato de que, apesar da maioria das lesões precursoras (NIVs) estarem associada ao HPV, a maioria dos CE de vulva surge por uma via não relacionada ao HPV (15).

As lesões precursoras da via carcinogênica mais comum, as NIVs diferenciadas, são provavelmente subdiagnosticadas, especialmente como lesão isolada, pois apresentam uma curta fase intraepitelial e critérios histopatológicos de difícil aplicabilidade pelos patologistas (26,36,40).

A NIV diferenciada pode ser considerada um diagnóstico difícil, tanto clínica quanto histologicamente, existindo grande variabilidade interobservador (39,57). Soma-se a essa dificuldade a maior probabilidade de evolução para carcinoma invasor em curto espaço de tempo, quando comparada a NIV usual (11,18). Além disso, muitas lesões previamente diagnosticadas histologicamente como líquen escleroso provavelmente deveriam receber o diagnóstico de NIV diferenciada (26). Como a NIV diferenciada é subdiagnosticada, provavelmente também é subtratada. Um reconhecimento melhor dessa lesão por ginecologistas e patologistas poderia oferecer oportunidade de prevenir alguns cânceres de vulva (58).

O uso da imuno-histoquímica poderia tornar mais fácil o diagnóstico de NIV diferenciada (26), o que é fundamental dada a relevância dessa lesão como precursora do tipo de carcinoma mais comum na vulva: o carcinoma epidermoide queratinizante não associado ao HPV (15,18,36).

Apesar dos casos de carcinoma epidermoide de vulva associados ao HPV não representarem a maioria dos casos, o mesmo não é verdadeiro para os casos de

NIV usuais clássicas (associadas ao HPV) que representam a maioria das NIV diagnosticadas (13,35).

Em vista dessa contradição na epidemiologia da doença, há claramente necessidade de um melhor entendimento da carcinogênese vulvar, pois existe a possibilidade de estar ocorrendo classificação errônea de muitas lesões. Uma das medidas propostas para o diagnóstico correto do subtipo de NIV é a utilização de métodos auxiliares ao diagnóstico histológico para identificação vias carcinogênicas. Um desses métodos é a imuno-histoquímica, técnica amplamente empregada no dia a dia dos laboratórios de anatomia patológica, que poderia ser utilizada para auxiliar a estabelecer parâmetros objetivos de risco, alvos terapêuticos para novas drogas e intervenções e melhorar o processo de rastreamento de lesões (1).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Realizar uma revisão dos laudos anatomopatológicos de vulva fornecidos pelo Serviço de Patologia do HCPA, reclassificando os mesmos de acordo com a nomenclatura proposta pela ISSVD.

- Separar morfologicamente, após revisão diagnóstica, as NIVs e os carcinomas epidermoides em duas vias: associada e não associada ao HPV.

- Estudar as duas vias da carcinogênese vulvar através da correlação da expressão imuno-histoquímica do p53 com aspectos histopatológicos e dados clínicos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a concordância dos diagnósticos fornecidos pelo Serviço de Patologia do HCPA com os diagnósticos dos pesquisadores.

- Determinar a incidência, em nosso meio, do Líquen escleroso, dos condilomas acuminados, das NIVs e do carcinoma epidermoide invasor, com especial ênfase à NIV diferenciada.

- Determinar o perfil das pacientes estudadas utilizando dados coletados dos prontuários.

- Verificar se o uso imuno-histoquímico do p53 auxilia no diagnóstico de NIV diferenciada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nogueira MC, Guedes Neto EDP, Rosa MW, Zettler E, Zettler CG. Immunohistochemical expression of p16 and p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva. *Pathology oncology research POR* . 2006;12(3):153–7.
2. Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer causes & control : CCC* . 2009 Nov [cited 2013 Apr 14];20(9):1779–82.
3. Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-2007-a nationwide population-based study. *Gynecologic Oncology* . Elsevier B.V.; 2011;122(1):45–9.
4. Fischer D, Katalinic A, Mundhenke C, Dittmer C, Diedrich K, Thill M. Epidemiology of vulvar and vaginal carcinoma. *Onkologe*. 2009;15(1):8–+.
5. Van De Nieuwenhof HP, Van Kempen LCLT, De Hullu JA, Bekkers RLM, Bulten J, Melchers WJG, 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*. 2009;18(7):2061–7.
6. Walboomers JM, Jacobs M V, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999 Sep;189(1):12–9.
7. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2009 Apr 1;124(7):1626–36.

8. Scurry J, Champion M, Scurry B, Kim SN, Hacker N. Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2006;25(2):176–81.
9. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2013 Jan;62(1):161–75.
10. Van Der Avoort IAM, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JMM, De Hullu JA, De Wilde PCM, et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2006;25(1):22–9.
11. Hoevenaars BM, Van der Avoort IAM, De Wilde PCM, Massuger LFAG, Melchers WJG, De Hullu JA, 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*. 2008 Dec 15;123(12):2767–73.
12. De Koning MNC, Quint WG V, Pirog EC. Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc. Nature Publishing Group*; 2008;21(3):334–44.
13. Scurry J, Champion M, Scurry B, Kim SN, Hacker N. Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2006/04/25 ed. 2006;25(2):176–81.
14. Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG, Du Q, Malkki M, Wilkerson H-W, et al. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer*

- Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2008 Jul;17(7):1790–9.
15. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology*. Elsevier Inc.; 2013 Jan;62(1):161–75.
 16. Fonseca-Moutinho JA. Vulvar intraepithelial neoplasia: a current problem. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*. 2008;30(8):420–6.
 17. Shafi MI, Luesley DM, Byrne P, Samra JS, Redman CW, Jordan JA, et al. Vulval intraepithelial neoplasia-management and outcome. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1989 Nov;96(11):1339–44.
 18. Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. *J Skin Cancer*. ed. 2011;2011:951250.
 19. Scurry J, Wilkinson EJ. Review of terminology of precursors of vulvar squamous cell carcinoma. *J Low Genit Tract Dis* ed. 2006;10(3):161–9.
 20. Heller DS. Report of a new ISSVD classification of VIN. *Journal of lower genital tract disease*. 2007 Jan ;11(1):46–7.
 21. Monsálvez V, Rivera R, Vanaclocha F. [Lichen sclerosus]. *Actas dermo-sifiliográficas*;101(1):31–8.
 22. Van De Nieuwenhof HP, Van Der Avoort IAM, De Hullu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Critical reviews in oncologyhematology*. 2008;68(2):131–56.
 23. Meffert JJ, Davis BM, Grimwood RE. Lichen sclerosus. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1995 Mar;32(3):393–416; quiz 417–8.

24. Gutiérrez-Pascual M, Vicente-Martín FJ, López-Estebanz JL. Lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. *Actas dermo-sifiliográficas*. 2012 Jan;103(1):21–8.
25. Fung MA, LeBoit PE. Light microscopic criteria for the diagnosis of early vulvar lichen sclerosus: a comparison with lichen planus. *The American journal of surgical pathology*. 1998 Apr;22(4):473–8.
26. Van De Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, Van Der Zee AGJ, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc. Nature Publishing Group*; 2011;24(2):297–305.
27. Powell JJ, Wojnarowska F. Lichen sclerosus. *Lancet*. 1999 May 22;353(9166):1777–83.
28. Val I, Almeida G. An overview of lichen sclerosus. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2005 Dec;48(4):808–17.
29. Van der Avoort IAM, Van de Nieuwenhof HP, Otte-Höller I, Nirmala E, Bulten J, Massuger LFAG, et al. High levels of p53 expression correlate with DNA aneuploidy in (pre)malignancies of the vulva. *Human pathology*. 2010 Oct;41(10):1475–85.
30. Neill SM, Lewis FM, Tatnall FM, Cox NH. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of lichen sclerosus 2010. *The British journal of dermatology*. 2010 Oct;163(4):672–82.
31. Derrick EK, Ridley CM, Kobza-Black A, McKee PH, Neill SM. A clinical study of 23 cases of female anogenital carcinoma. *The British journal of dermatology*. 2000 Dec;143(6):1217–23.
32. Chiesa-vottero A, Dvoretzky PM, Hart WR. Histopathologic Study of Thin Vulvar Squamous Cell Carcinomas and Associated Cutaneous Lesions

- Adjacent Vulvar Intraepithelial Neoplasia Types and Lichen Sclerosus. *Cell*. 2006;30(3):310–8.
33. Poulsen H, Junge J, Vyberg M, Horn T, Lundvall F. Small vulvar squamous cell carcinomas and adjacent tissues. A morphologic study. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2003 Sep;111(9):835–42.
 34. Crum, C.P., M.R. Nucci and KRL. *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology*. Elsevier Health Sciences.; 2011.
 35. Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2001;20(1):16–30.
 36. McCluggage WG. Recent developments in vulvovaginal pathology. *Histopathology*. 2009 Jan;54(2):156–73.
 37. Garland SM, Steben M, Sings HL, James M, Lu S, Railkar R, et al. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. *The Journal of infectious diseases*. 2009 Mar 15;199(6):805–14.
 38. Herod JJO, Shafi MI, Rollason TP, Jordan JA, Luesley DM. Vulvar intraepithelial neoplasia with superficially invasive carcinoma of the vulva. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1996 May;103(5):453–6.
 39. Yang B, Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24(3):429–41.
 40. Fox H, Wells M. Recent advances in the pathology of the vulva. *Histopathology*. 2003;42(3):209–16.
 41. Van De Nieuwenhof HP, Massuger LFAG, Van Der Avoort IAM, Bekkers RLM, Casparie M, Abma W, et al. Vulvar squamous cell carcinoma development

- after diagnosis of VIN increases with age. *European Journal of Cancer* . 2009;45(5):851–6.
42. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* . 2007 Jun;28(6):622–9.
 43. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation* . 2003 Apr;10(4):431–42.
 44. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research* . 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304–11.
 45. Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M, et al. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* . 1991 Oct;6(10):1785–9.
 46. Hillemanns P, Wang X. Integration of HPV-16 and HPV-18 DNA in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology* . 2006;100(2):276–82.
 47. Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Yip PS, Tsao SW. Abnormal expression or mutation of TP53 and HPV in vulvar cancer. *European Journal of Cancer*. 1999;35(3):481–4.
 48. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* . 1990 Dec;63(6):1129–36.
 49. Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*. 329(6136):219–22.
 50. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and cellular biology* . 1988 Feb;8(2):531–9.

51. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon J V, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* . 1990 Oct;87(19):7555–9.
52. Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer surveys* . 1992 Jan;12:197–217.
53. Hantschmann P, Sterzer S, Jeschke U, Friese K. P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosus. *Anticancer Research* . 2005;25(3A):1739–45.
54. Pilotti S, D'Amato L, Della Torre G, Donghi R, Longoni A, Giarola M, et al. Papillomavirus, p53 alteration and primary carcinoma of the vulva. *Diagnostic molecular pathology the American journal of surgical pathology part B*. 1995. p. 239–48.
55. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, 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*. 2003 Sep;90(3):547–51.
56. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suárez H, et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(11):1347–56.
57. Mulvany NJ, Allen DG. Differentiated intraepithelial neoplasia of the vulva. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* . 2008;27(1):125–35.
58. Kokka F, Singh N, Faruqi A, Gibbon K, Rosenthal AN. Is differentiated vulval intraepithelial neoplasia the precursor lesion of human papillomavirus-negative vulval squamous cell carcinoma? *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* . 2011 Oct;21(7):1297–305.

5. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS LESÕES VULVARES SEGUNDO AS VIAS CARCINOGENÉTICAS

Raquel Camara Rivero¹, Deborah Garcia², Luciano Serpa Hammes³, Lúcia Maria Kliemann⁴, Edison Capp⁵

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UFRGS e Médica Patologista do HCPA

²Acadêmica da Faculdade de Enfermagem da UFRGS

³Superintendente de Educação Pesquisa e Responsabilidade Social do Hospital Moinhos de Vento

⁴Professora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS e Preceptora da Residência Médica em Patologia do HCPA

⁵Professor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UFRGS e Preceptor da Residência Médica em Ginecologia do HCPA

Correspondência:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar - Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: edcapp@ufrgs.br

RESUMO

Introdução: o carcinoma epidermoide invasor (CE) de vulva é uma doença rara, que corresponde a cerca de 3-5% dos tumores malignos do trato genital feminino e a 90% de todas as neoplasias primárias da vulva. Existem duas vias para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais (NIVs) e CE vulvar: uma via não relacionada ao papilomavírus humano (HPV) e outra relacionada ao HPV, com características clínicas, patológicas e epidemiológicas distintas. **Objetivos:** estudar as duas vias da carcinogênese vulvar, realizando correlação da expressão imuno-histoquímica do p53 com a histologia. **Métodos:** foi realizado estudo retrospectivo de caso-controle com 76 casos. Esses foram reclassificados conforme a terminologia da Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD, 2004), tendo sido realizada imuno-histoquímica para p53 e revisão de dados clínicos. **Resultados:** foram identificados 26 casos normais, 15 casos da via associada ao HPV (12 de NIV usual; 3 de CE condilomatoso) e 13 casos da via não associada ao HPV (5 de NIV diferenciada; 8 de CE queratinizante). A expressão do p53 nas vias carcinogênicas apresentou diferenças significativas: na via não associada ao HPV o p53 apresentou maior percentagem de células coradas (>25%, $p<0,001$), padrão basal com extensão ao terço médio para as NIV diferenciadas e difuso ou infiltrativo para os CE ($p<0,001$). A via carcinogênica associada ao HPV apresentou marcação de p53 menos extensa (até 10% das células, $p<0,001$), com padrão basal para as NIV usuais, sendo negativo para p53 nos CE condilomatosos ($p<0,001$). Encontramos diferenças entre as idades ($p<0,05$), sendo que as pacientes da via não associada ao HPV apresentaram média de 66 anos e as da via associada, média de 44 anos. **Conclusão:** existe um padrão característico, baseado na histologia e expressão do p53, que separa as lesões vulvares em duas vias carcinogênicas distintas. Propomos o uso rotineiro imuno-histoquímico do p53 simultâneo ao diagnóstico histológico em todos os casos de NIV e CE vulvar, pois isso auxiliaria na definição da via carcinogênica, permitindo um melhor acompanhamento clínico das pacientes.

Palavras chave: carcinoma epidermoide vulvar, neoplasia intraepitelial vulvar, papilomavírus humano, p53, carcinogênese vulvar, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

O CE vulvar é uma doença rara, que corresponde a cerca de 3-5% dos tumores malignos do trato genital feminino e a 90% de todas as neoplasias malignas primárias da vulva (1). A incidência de CE de vulva vem aumentando nos EUA (2) e Europa (3) e no Brasil é uma das mais altas do mundo, sendo Porto Alegre (RS) uma das capitais com maior número de novos casos (1). A carcinogênese vulvar não é tão diretamente associada ao HPV quanto a carcinogênese do colo uterino, onde cerca de 100% dos CE são associados ao HPV (4). Na vulva, cerca de 40% dos CE apresentam essa associação (5,6), sendo encontradas neoplasias intraepiteliais vulvares (NIV) adjacentes ao CE em 50-70% dos casos (7). Fortes evidências acumuladas demonstram que existem duas vias etiopatogênicas diferentes para o desenvolvimento de NIV e CE vulvar: uma não relacionada ao HPV e outra relacionada ao HPV (8,9), com diferentes características clínicas, patológicas e epidemiológicas (7). A via não associada ao HPV ocorre em mulheres mais velhas e leva ao CE queratinizante, frequentemente em um “background” de líquen escleroso e NIV diferenciada. A via associada ao HPV ocorre em mulheres mais jovens, leva ao CE basaloide ou condilomatoso e está associada à NIV usual (8,9).

Via associada ao HPV – NIV usual: a epiderme é espessada, com hiperparaceratose, perda da maturação celular com atipia nuclear em todas as camadas do epitélio, multinucleação e numerosas mitoses, incluindo mitoses atípicas. Atipias coilocíticas podem estar ou não presentes. Envolvimento do epitélio folicular dos anexos cutâneos e melanófagos no derma papilar são característicos (7,10,11). Lesões vulvares com alterações citopáticas relacionadas ao HPV e displasia de baixo grau correspondem aos condilomas acuminados e assim devem ser diagnosticadas, pois muito raramente, ou nunca, progridem para CE vulvar (7).

Via associada ao HPV – carcinoma epidermoide invasor basaloide e condilomatoso: correspondem a 40% dos CE vulvares e cerca de 80-90% são associados ao HPV16 (10,12). O CE basaloide apresenta células com alta relação núcleo-citoplasmática, crescimento coeso, pouca queratinização e pseudo-coilocitose (7,10). O CE condilomatoso exhibe ninhos celulares bulbosos ou irregulares, frequente queratinização e alterações coilocíticas proeminentes (7).

Via não associada ao HPV - NIV diferenciada: compreende de 2 a 5% dos casos de NIV, acomete mulheres em faixa etária mais avançada que a NIV usual, com média de 67 anos (13) e geralmente é unifocal (9,14). O potencial de progressão da NIV diferenciada parece ser maior do que o da NIV usual (14), sendo caracterizada como uma lesão que pode rapidamente evoluir para CE (9). A NIV diferenciada apresenta dificuldade diagnóstica (15,16), sendo considerada precursora do CE queratinizante (14) e mais frequentemente diagnosticada adjacente ao mesmo, em continuidade ao líquen escleroso (7). Identifica-se epitélio acantótico bem diferenciado, pontes celulares proeminentes, queratinócitos atípicos aumentados e hipercromáticos, com núcleo vesicular, macronúcleolo, citoplasma abundante e eosinofílico, localizados na camada basal. Vê-se alongamento e anastomose dos cones interpapilares, falha de maturação, espongirose, hiperqueratose e parakeratose (7,17).

Via não associada ao HPV – carcinoma epidermoide invasor queratinizante: apresenta maturação e queratinização, pérolas de queratina e ausência de alterações coilocíticas (7).

Uso imuno-histoquímico do p53: a alteração genética mais comumente relacionada ao câncer é a mutação do gene supressor de tumores p53 (18), peça chave na manutenção da integridade genômica, responsável por reconhecer danos ao DNA e interromper o ciclo celular nas fases G1 ou G2 para permitir o seu reparo. Em resposta a estresse o p53 se torna ativado, o que leva a alterações fenotípicas que podem variar do reparo ao DNA, à senescência e à apoptose (19). A inativação do p53 é um importante evento celular durante a carcinogênese (20). A oncoproteína E6 do HPV de alto risco liga-se ao p53, levando a uma disfunção do mesmo e interferindo na interrupção do ciclo celular (9). Células infectadas por HPV têm níveis baixos de proteína p53 (21). Outro mecanismo envolvido na carcinogênese é a mutação do p53 com superexpressão dos polipeptídeos mutantes comprometendo a atividade e inativando o gene selvagem (22). Frequentemente as mutações têm potencial oncogênico e meia-vida mais longa, resultando em acúmulo de p53 em células tumorais, o que está relacionado à perda do controle do crescimento e imortalização celulares (23). A superexpressão imuno-histoquímica de p53 é sinônimo de mutação, mas nem todas as mutações levam a uma superexpressão do

p53. Nesses casos, uma deleção de função pode ser o mecanismo inicial. O anticorpo imuno-histoquímico anti-p53 reage tanto com o tipo selvagem quanto com as formas mutantes. Ocorre uma baixa expressão de p53 no epitélio vulvar normal. Casos de p53 negativo podem ocorrer por mutações negativas (“null mutations”) verdadeiras ou pela rápida degradação do p53 ligado à proteína E6 do HPV (24); assim, a via carcinogênica associada ao HPV apresenta menor expressão ou negatividade para p53. A via carcinogênica não associada ao HPV apresenta maior expressão do p53 devido a acúmulos celulares da proteína mutada (9). Esse marcador poderia ser utilizado para confirmação do diagnóstico histológico (9).

O objetivo deste trabalho foi analisar as duas vias da carcinogênese vulvar através da correlação da expressão imuno-histoquímica do p53 com aspectos histopatológicos e dados clínicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas, a partir do sistema de Aplicativos de Gestão Hospitalar do HCPA (prontuário eletrônico), peças cirúrgicas designadas como região anatômica vulva e enviadas para anatomopatológico no Serviço de Patologia, entre janeiro de 2007 e dezembro de 2011. Esses casos tiveram seus prontuários revisados, tendo sido registrados idade e ocorrência de lesões únicas ou múltiplas, essas últimas caracterizadas como presença de outras lesões não contínuas em vulva, colo uterino, vagina ou região perianal. Os casos foram revisados por patologista pesquisador cego para o diagnóstico original e classificados de acordo com a nomenclatura da ISSVD nas categorias: benigno, líquen escleroso, condiloma acuminado, NIV usual, NIV diferenciada, CE queratinizante, CE basaloide, CE condilomatoso. Foi realizada imuno-histoquímica para p53 em todos os casos selecionados. Os casos de NIV e carcinoma foram separados em dois grupos: via associada ao HPV e via não associada ao HPV (5,7,9,12,14,25,26).

Amostragem: a amostra incluiu casos de líquen escleroso, condiloma acuminado, NIV e CE. Também foram incluídos os casos de pele normal ou com mínimas alterações benignas inespecíficas para controle. Foram excluídos casos

cujos diagnósticos não estavam relacionados às vias carcinogênicas: nevo melanocítico intradérmico, melanoma, cisto de Bartholin, vulvite herpética, trombose vascular, molusco contagioso. Também foram excluídos casos cujo material disponível na biópsia foi considerado exíguo para realização de exame imuno-histoquímico e aqueles cujos blocos de parafina não foram localizados.

Imuno-histoquímica (IHQ): foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-p53 [clone BP53-12-1] da Biogenex (Freemont, Canadá) em processamento manual no Laboratório do Centro de Pesquisa do HCPA. Após realização de novos cortes dos blocos de parafina, estes foram desparafinizados, hidratados em concentrações crescentes de etanol e colocados em solução tampão salina de fosfato. O anticorpo foi diluído na proporção de 1:50 e usado após pré tratamento em microondas com tampão citrato de sódio pH 6,0 (Merck, Alemanha) por 20 minutos e bloqueio da peroxidase endógena por peróxido de hidrogênio a 10% por 10 minutos. Foi efetuada coloração com método ABC (complexo avidina-biotina). Para contracoloração foi usada hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi usado carcinoma ductal infiltrante de mama p53 positivo.

Interpretação dos resultados imuno-histoquímicos: foi realizada de forma retrospectiva e cega para o diagnóstico anatomopatológico, de acordo publicação de Hantschmann et al. (24), sendo usados como parâmetros para avaliação do p53: intensidade, percentagem e padrão de expressão. Para avaliação da intensidade da coloração, foi usado o esquema da tabela 1. A percentagem de células positivas foi estimada pela contagem de 200 células, sendo classificada em subgrupos de: 0%, 1-10%, 11-25%, 26-50% e maior que 50% (24). O padrão de positividade foi caracterizado como: difuso, basal ou infiltrativo, de acordo com a proposta de Hantschmann et al. (24)

Análise estatística: os resultados foram inseridos em tabelas do programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft, EUA). Os dados foram analisados no programa Statistical Package for Social Sciences - versão 20 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Foram usadas percentagens e médias para as estatísticas descritivas de frequências dos diagnósticos e avaliação de concordância entre diagnóstico revisado e original. O teste de Kruskal-Wallis avaliou as categorias de intensidade e percentagem do p53. A seguir, para comparação entre os grupos foi realizado Teste de Dunn com

correção de Bonferroni. A avaliação do padrão do p53 foi realizada com o Teste Exato de Fisher. Para comparações múltiplas foi efetuado Teste Z com correção de Bonferroni. No estudo comparativo estatístico das vias carcinogênicas foi usado o teste T para idades das pacientes, enquanto para comparação da presença de lesões únicas versus múltiplas foi efetuado Teste Exato de Fisher. Na imunohistoquímica, para o padrão do p53 também foi realizado Teste Exato de Fisher, enquanto no estudo da percentagem de intensidade foi utilizado Teste de Mann Whitney. Foram considerados valores de $p < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

Foram encontrados no total 162 casos de 2007 a 2011. Entre esses, 12% (n=20) receberam originalmente diagnóstico de CE, 17% (n=28) lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (incluindo condiloma acuminado), 11% (n=18) de NIV alto grau, 1% (n=2) melanomas, 28% (n=45) diagnósticos benignos específicos (incluindo líquen escleroso, herpes, molusco contagioso, cisto de Bartholin, entre outros), 29% (n=46) benignos descritivos inespecíficos, apenas 1% (n=2) material insuficiente para diagnóstico e 1% (n=1) mucosa sem alterações.

Para este estudo foram selecionados 76 exames, obtidos de 72 pacientes com média geral de idade de 52 ± 19 anos, variando entre 17 e 82 anos.

Os casos de CE corresponderam a 90% das malignidades vulvares no HCPA, o que está de acordo com a literatura (7). A nomenclatura utilizada pelos patologistas em nosso meio não é homogênea, sendo aplicados para lesões neoplásicas invasoras e intraepiteliais de vulva os mesmos critérios utilizados para diagnóstico de lesões do colo uterino. A concordância geral da nomenclatura após revisão e aplicação da classificação da ISSVD foi de 57,9%, chegando a 0% nos diagnósticos de NIV e CE. Separando-se os casos nas categorias benigno e maligno, sem levar em conta a nomenclatura, a concordância foi de 94,7% com relação a critérios morfológicos de displasia e invasão.

Foram diagnosticados 25 casos benignos inespecíficos (34% do total de diagnósticos). As idades das pacientes variaram entre 30 e 82 anos (55 ± 16 anos). Houve discordância em um diagnóstico histológico, originalmente denominado lesão escamosa intraepitelial de baixo grau e reclassificado após revisão como alteração

benigna. Esse caso foi negativo para p53. Entre os demais, 85% apresentaram expressão de p53 em até 10% das células (n=22), entre os quais 7 foram negativos e 15 apresentaram marcação de 1-10%. Todos os casos com positividade até 10% apresentaram padrão basal. Quatro casos apresentaram intensidade 3, padrão extenso de coloração e percentagem superior a 26% das células (com 2 apresentando mais de 50% das células positivas).

Foram identificados 8 casos de líquen escleroso (12% do total de diagnósticos). Não houve discordância diagnóstica. A média de idade das pacientes foi de 61 ± 15 anos e todas apresentavam lesão única. A marcação imunohistoquímica apresentou padrão basal e percentagem máxima de até 10% de células positivas em 7 de 8 casos (87,5%), sendo 1 caso negativo para p53. Cinco dos 8 casos apresentaram intensidade 2 na marcação, três casos apresentaram intensidade 3.

Foram diagnosticados 15 casos de condiloma acuminado vulvar (20% do total de diagnósticos), com 93% de concordância diagnóstica. A média de idade foi de 38 ± 16 anos. Após revisão do prontuário, 13 pacientes apresentavam descrição mais detalhada dos aspectos clínico-ginecológicos, dentre as quais 69% (n=9) tinham relato de lesões múltiplas em trato genital e 31% (n=4) lesões únicas. A coloração de p53 apresentou padrão basal em 100% dos exames. A percentagem foi até 10% em 93% dos casos. Cinco casos apresentaram intensidade 1 (33%), 8 intensidade 2 (53%) e 2 intensidade 3 (13%).

Foram diagnosticados 17 casos de NIV no total (22% do total de diagnósticos). Dessas, 12 receberam diagnóstico de NIV usual após revisão (16% do total e 71% das NIVs), com média de idade de 45 ± 17 anos, 67% (n=8) apresentando lesões únicas, 25% (n=3) lesões múltiplas e 8% (n=1) sem informações disponíveis. Todos os casos foram originalmente diagnosticados como lesão escamosa intraepitelial de alto grau (NIV 3), o que levou a uma discordância de nomenclatura de 100%, apesar da concordância de critérios diagnósticos para displasia. O p53 apresentou marcação restrita à basal em 100% dos exames, intensidade 2 em 75% (n=9) dos casos, 3 em 17% (n=2) e 1 em 8% (n=1) (tabela 2). Com relação à percentagem de células positivas, 75% (n=9) apresentaram

positividade de até 10%, enquanto 17% (n= 2) de até 25% e 8% (n=1) até 50% (figura 1).

Foram diagnosticados, após revisão, 5 casos de NIV diferenciada (6% do total e 29% das NIVs) (figura 2). Três casos foram originalmente diagnosticados como NIV3, enquanto dois casos foram identificados na margem de CE queratinizante, em “background” de líquen escleroso. Originalmente não foi identificado nenhum caso onde foi utilizada a nomenclatura de NIV diferenciada (100% de discordância na nomenclatura). A média de idade das pacientes foi de 57 ± 22 anos. Na imunohistoquímica, 100% dos casos apresentaram padrão de expressão com extensão suprabasal, positividade forte e alta percentagem de células coradas (26-50%).

Foram diagnosticados 11 casos de CE (14% do total de diagnósticos). A nomenclatura proposta pela ISSVD não foi utilizada em nenhum caso, porém não houve discordância com relação aos critérios de malignidade. Dentre os carcinomas epidermóides, 8 foram classificados como CE queratinizante (figura 3), compreendendo 73% dos casos de carcinoma (10% do total). A idade média das pacientes foi de 75 ± 5 anos e todas possuíam lesões únicas. Três casos apresentavam NIV diferenciada associada, sendo que desses, dois apresentavam também líquen escleroso adjacente. Todos foram positivos para p53 com intensidade máxima e positividade superior a 10%, sendo 75% (n=6) com positividade maior que 26%. Nenhum caso apresentou padrão basal de marcação e 75% apresentaram marcação difusa ou infiltrativa.

Foram diagnosticados 3 casos de CE de tipo condilomatoso (“warty”)(figura 4), o que corresponde a 27% dos carcinomas e 4% do total de diagnósticos. A idade média foi de 44 ± 20 anos e 67% (n=2) foram negativos para p53. O caso positivo apresentou pequena percentagem de células coradas (até 10%). Não foi diagnosticado nenhum CE de tipo basaloide na amostra.

Separando-se os casos de NIV e CE nas vias associada e não associada ao HPV, encontramos 15 casos na via associada e 13 na via não associada ao HPV. Na via associada ao HPV as pacientes tinham idade de 44 ± 16 anos e na via não associada, 66 ± 16 anos ($p < 0,05$). Não houve diferença quanto ao número de lesões (únicas ou múltiplas) entre as vias ($p = 0,341$) (tabela 3).

Avaliando-se a expressão de p53 nas vias associada ao HPV e não associada ao HPV, houve diferença significativa na intensidade, onde 100% dos casos da via não associada ao HPV apresentaram intensidade 3 ($p=0,001$). Na percentagem também encontramos diferenças, sendo que as superiores a 26% estavam relacionadas à via não associada ao HPV e as percentagens baixas de 0 até 10% estavam relacionadas à via associada ao HPV ($p<0,001$). O padrão basal foi significativamente relacionado à via associada ao HPV, enquanto os padrões de extensão suprabasal e difuso foram relacionados significativamente à via não associada ao HPV ($p<0,001$) (tabela 4).

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas as duas vias da carcinogênese vulvar através da correlação da expressão imuno-histoquímica do p53 com aspectos histopatológicos e dados clínicos. Nos casos benignos nenhum falso-negativo para displasia de alto grau ou malignidade foi encontrado. A expressão do p53 foi compatível com o esperado para pele normal de acordo com a literatura (24), identificando-se intensidade fraca, padrão basal e percentagem de até 10%. Essa marcação corresponde à proteína p53 selvagem, não mutada, presente no epitélio normal predominantemente na porção basal (mitoticamente ativa) (24). Neste grupo, a análise da imuno-histoquímica em quatro casos (16%) mostrou uma expressão com máxima intensidade, padrão extenso além da basal e alta percentagem de positividade. Após revisão dos prontuários, foi verificado que essas pacientes apresentavam carcinoma de vulva simultâneo em outra localização ou já diagnosticado previamente. Esse achado reforça a hipótese de que a mutação do p53 é importante na carcinogênese vulvar (27), e sugere que a detecção da mutação possa estar relacionada ao risco de desenvolver a doença (24), o que ainda precisa ser confirmado.

Após revisão das lâminas, os diagnósticos originais de líquen escleroso foram todos mantidos, sendo acrescentados dois casos novos identificados nas margens de CE queratinizante, junto a NIV diferenciada. Semelhante ao encontrado na literatura (28), a idade das pacientes foi 61 ± 15 anos e todas tinham lesão única. A descrição clínica de “lesão em padrão de 8” envolvendo lábios menores e ânus não foi identificada, tampouco a associação de até 20% de envolvimento extragenital

(28). A percentagem de células p53 positivas não excedeu 10%, enquanto na literatura percentagem encontrada foi de 30% (29). Estudo prévio também demonstrou que a marcação imuno-histoquímica ficou restrita à camada basal com 25% dos casos negativos para p53 (24), enquanto na amostra estudada esses casos corresponderam a 12,5%. De acordo com a literatura (29) a aneuploidia de DNA se correlaciona com alta expressão de p53. Assim, os achados de baixa expressão indicam um padrão não mutado do p53 no líquen escleroso, o que precisa ser confirmado por microdissecção do DNA.

Entre os diagnósticos originais, um caso foi diagnosticado como NIV1, nomenclatura que deve ser abandonada (7). Esse caso, após revisão, foi considerado alteração benigna e apresentou negatividade para p53. A maioria dos casos restantes de alterações de baixo grau com presença de atipias colócíticas foi denominada condiloma acuminado, com exceção de dois com diagnóstico descritivo de papiloma escamoso de etiologia viral. O uso de diagnóstico descritivo não está preconizado em nenhuma das fontes estudadas (14,25), razão pela qual, apesar de morfológicamente correto (esses casos não foram considerados discordância de diagnóstico, mas sim de nomenclatura), esse uso deve ser desencorajado. A expressão do p53 foi 100% de padrão basal, 93% com até 10% de positividade e 53% de intensidade 2, de acordo com o esperado para uma lesão associada ao HPV (24).

A NIV usual foi detectada em pacientes com média de 45 ± 17 anos, o que está de acordo com média de 40 anos descrita na literatura (10). Cerca de 40% das pacientes apresentava doença multicêntrica, enquanto na nossa casuística encontramos 25% de casos com relato de doença em outros locais do trato genital (10).

Os casos de NIV diferenciada corresponderam a 6% do total, apresentando idade média de 57 ± 22 anos e predomínio de lesão única, o que está de acordo com a literatura (13,14). Não foi possível avaliar se o aspecto clínico correspondia a quantidade limitada de pele envolvida, como descrito como descrito na literatura (9), já que a informação sobre o tamanho das lesões não estava disponível nos prontuários eletrônicos. Neste estudo, 40% dos casos de NIV diferenciada estavam localizados junto às margens de CE, semelhante a outro trabalho já publicado (13).

Todos os casos de CE associados à NIV diferenciada foram do tipo queratinizante, pois a NIV é considerada precursora desse subtipo específico (14). A NIV diferenciada tem recebido pouca atenção por parte dos patologistas (16), pois nenhum caso recebeu esse diagnóstico originalmente. Apenas cinco casos foram identificados após revisão, o que confirma a raridade desse diagnóstico. A NIV diferenciada, além de ser de difícil identificação histológica, apresenta uma curta fase intraepitelial evoluindo rapidamente para carcinoma invasor, o que dificultaria sua detecção (16,17). Também foi possível observar, nos casos das lesões associadas a CE queratinizante, a concomitância de NIV diferenciada com líquen escleroso (7,9,10) A hipótese de que a NIV diferenciada é diagnosticada erroneamente como lesão benigna ou até mesmo epitélio normal (15,16) não foi confirmada, já que as pacientes haviam recebido originalmente o diagnóstico de NIV3. Em trabalho de revisão (30) foram avaliados 60 casos com diagnóstico de líquen escleroso com progressão para CE ("follow-up" mínimo de 10 anos), dentre os quais 42% (25 de 60) foram reclassificados como NIV diferenciada. É possível que a ausência de casos de líquen escleroso que tenham sido reclassificados como NIV diferenciada na presente amostra seja devida ao número pequeno de casos estudados. A NIV diferenciada mostrou extensão suprabasal e alta percentagem de positividade de p53, enquanto a NIV usual apresentou padrão basal e baixa percentagem de positividade ($p < 0,05$), o que está de acordo com a literatura (7).

A média de idade para os pacientes com CE condilomatoso foi 44 ± 20 anos, enquanto as pacientes com CE queratinizante apresentaram média de 66 ± 5 anos ($p < 0,05$), o que foi semelhante ao encontrado na literatura (8,9). Os casos da via associada ao HPV corresponderiam a cerca de 40% dos CE (12), enquanto que na casuística estuda corresponderam a 27% do total. Além disto, duas das três pacientes com CE condilomatoso apresentaram relatos de lesões multicêntricas, com concomitância de lesões no colo uterino. Os casos de carcinoma queratinizante corresponderam à maioria dos carcinomas, conforme o esperado (12).

CONCLUSÕES

Comparando os diagnósticos de NIVs e CE, é possível separá-los em duas vias carcinogênicas com histologia, imuno-histoquímica e com idades no diagnóstico significativamente diferentes. Assim, a separação das vias carcinogênicas pode ser

feita de forma simples no dia a dia do laboratório com o uso rotineiro do p53 simultâneo ao diagnóstico histológico em nos casos de NIV e CE.

Foi confirmado o paradoxo (6,7,11) de que a maioria das lesões precursoras pertence à via associada ao HPV, enquanto a maioria dos carcinomas epidermóides pertence à via não associada ao HPV. Essa baixa incidência de carcinomas na via associada ao HPV, apesar do elevado número de lesões precursoras, poderia ser explicada pelo uso mais liberal da biópsia, o que contribuiria para o diagnóstico precoce e tratamento de lesões iniciais que evoluíram para CE (13). Outro fator relevante é a facilidade para realização do diagnóstico histológico de NIV usual comparativamente à NIV diferenciada.

Uma caracterização mais adequada das lesões vulvares pré-malignas e malignas é possível e poderia melhorar o acompanhamento clínico, tornando-o mais específico para cada paciente ao separá-las em grupos de risco através do melhor entendimento do seu processo carcinogênico. A imuno-histoquímica do p53 simultâneo ao diagnóstico histológico em todos os casos de NIV e CE deveria ser feita como rotina, pois isso auxiliaria a definição diagnóstica.

BIBLIOGRAFIA

1. Nogueira MC, Guedes Neto EDP, Rosa MW, Zettler E, Zettler CG. Immunohistochemical expression of p16 and p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva. *Pathology oncology research POR* [Internet]. 2006;12(3):153–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16998595
2. Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer causes & control: CCC* [Internet]. 2009 Nov [cited 2013 Apr 14];20(9):1779–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2868506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-2007-a nationwide population-based study. *Gynecologic Oncology* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;122(1):45–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474166>

4. Van De Nieuwenhof HP, Van Kempen LCLT, De Hullu JA, Bekkers RLM, Bulten J, Melchers WJG, 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* [Internet]. 2009;18(7):2061–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19567503
5. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2013 Mar 27];124(7):1626–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19115209>
6. Scurry J, Champion M, Scurry B, Kim SN, Hacker N. Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2006/04/25 ed. 2006;25(2):176–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633069>
7. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Jan [cited 2013 Apr 14];62(1):161–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
8. Van Der Avoort IAM, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JMM, De Hullu JA, De Wilde PCM, et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* [Internet]. 2006;25(1):22–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0004347-200601000-00002>
9. Hoevenaars BM, Van der Avoort IAM, De Wilde PCM, Massuger LFAG, Melchers WJG, De Hullu JA, 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* [Internet]. 2008 Dec 15 [cited 2013 Mar 9];123(12):2767–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798277>
10. Crum, C.P., M.R. Nucci and KRL. *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology*. Elsevier Health Sciences.; 2011.
11. Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* [Internet]. 2001;20(1):16–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11192069>

12. De Koning MNC, Quint WG V, Pirog EC. Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008;21(3):334–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192968>
13. Van De Nieuwenhof HP, Van Der Avoort IAM, De Hullu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Critical reviews in oncologyhematology* [Internet]. 2008;68(2):131–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406622>
14. Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. *J Skin Cancer* [Internet]. 2010/12/29 ed. 2011;2011:951250. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188235>
15. Yang B, Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *The American journal of surgical pathology* [Internet]. 2000;24(3):429–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10716158
16. Fox H, Wells M. Recent advances in the pathology of the vulva. *Histopathology* [Internet]. 2003;42(3):209–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12605639>
17. Van De Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, Van Der Zee AGJ, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;24(2):297–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057461>
18. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Apr 16];28(6):622–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311302>
19. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation* [Internet]. 2003 Apr [cited 2013 Feb 28];10(4):431–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719720>
20. Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M, et al. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* [Internet]. 1991 Oct [cited 2013 Apr 21];6(10):1785–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717923>

21. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* [Internet]. 1990 Dec [cited 2013 Apr 21];63(6):1129–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867490904098>
22. Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* [Internet]. [cited 2013 Apr 21];329(6136):219–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2442619>
23. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and cellular biology* [Internet]. 1988 Feb [cited 2013 Apr 21];8(2):531–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=363177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Hantschmann P, Sterzer S, Jeschke U, Friese K. P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosus. *Anticancer Research* [Internet]. 2005;25(3A):1739–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033093>
25. Scurry J, Wilkinson EJ. Review of terminology of precursors of vulvar squamous cell carcinoma. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2006/07/11 ed. 2006;10(3):161–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829756>
26. Heller DS. Report of a new ISSVD classification of VIN. *Journal of lower genital tract disease* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Apr 14];11(1):46–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194951>
27. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, 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* [Internet]. 2003 Sep [cited 2013 Feb 28];90(3):547–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678722>
28. Monsálvez V, Rivera R, Vanaclocha F. [Lichen sclerosus]. *Actas dermatosifiliográficas* [Internet]. [cited 2013 Apr 22];101(1):31–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109390>
29. Van der Avoort IAM, Van de Nieuwenhof HP, Otte-Höller I, Nirmala E, Bulten J, Massuger LFAG, et al. High levels of p53 expression correlate with DNA aneuploidy in (pre)malignancies of the vulva. *Human pathology* [Internet]. 2010 Oct [cited 2013 Apr 24];41(10):1475–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656324>
30. Van de Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, Van der Zee AGJ, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have

progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Modern pathology* : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc [Internet]. 2011 Feb [cited 2013 Apr 22];24(2):297–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057461>

Legendas

Tabela 1. Intensidade da coloração de p53.

Tabela 2. Expressão do p53 nas lesões. NIV Difer: NIV diferenciada; Ca querat: CE queratinizante; Ca “warty”: CE condilomatoso/”warty”; Bas: basal; BasExt: basal com extensão ao terço médio; Infiltr: infiltrante; Dif:difuso; Aus:ausente K-W: Teste de Kruskal-Wallis; Fischer: Teste Exato de Fisher.

Tabela 3. Comparação das vias carcinogênicas quanto ao número de lesões.

Tabela 4. Expressão do p53 nas vias carcinogênicas. NIV Difer: NIV diferenciada; Ca querat: CE queratinizante; Ca “warty”: CE condilomatoso/”warty”; Bas: basal; BasExt: basal com extensão ao terço médio; Infiltr: infiltrante; Dif:difuso; Aus:ausente M-W: Teste de Mann Whitney; Fischer: Teste Exato de Fisher

Figura 1. NIV usual. A) Displasia com falha de maturação e atipias em dois terços do epitélio. HE, 100X; B) Marcação basal. p53, 100 X.

Figura 2. NIV diferenciada. A) Atipias, espongiase e fusão dos cones interpapilares, HE, 100X; B) Marcação com extensão suprarabasal, p53, 100 X

Figura 3. Carcinoma epidermoide queratinizante. A) Ninhos de carcinoma invadindo estroma. HE,100X; B) Expressão difusa do p53 nos ninhos invasores. p53, 100X.

Figura 4. Carcinoma epidermoide condilomatoso. A) Atipias coilocíticas em área invasora. HE 400X. B) Ausência de expressãodo p53. P53, 400X.

Tabela 1

Coloração	Intensidade
Nenhuma	zero
Fraca	1
Média	2
Forte	3

Tabela 2

	p53	NIV usual	NIV difer	Ca querat	Ca "warty"	p
percentagem	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,7%)	< 0,001*
	1-10	9 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	
	11-25	1 (8,3%)	0 (0%)	2 (25%)	0 (0%)	
	26-50	2 (16,7%)	5 (100%)	3 (37,5%)	0 (0%)	
	>50	0 (0%)	0 (0%)	3 (37,5%)	0 (0%)	
intensidade	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,7%)	0,001*
	1	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	2	7 (58,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1(33,3%)	
	3	4(33,3%)	5 (100%)	5 (100%)	0 (0%)	
	Bas	12(100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
padrão	BasExt	0 (0%)	5 (100%)	2 (25%)	0 (0%)	< 0,001**
	Infiltr	0 (0%)	0 (0%)	3 (37,5%)	0 (0%)	
	Dif	0 (0%)	0 (0%)	3 (37,5%)	1 (33,3%)	
	Aus	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,7%)	

* Kruskal-Wallis

** Teste Exato de Fisher

Tabela 3

	Via Associada ao HPV	Via Não Associada ao HPV	p
Lesões únicas	9 (60%)	9 (69%)	0,0341*
Lesões múltiplas	5 (33%)	1 (8%)	
Sem informações quanto ao número de lesões	1 (7%)	3 (23%)	

* Teste Exato de Fisher

Tabela 4

	p53	Via Associada ao HPV	Via Não Associada ao HPV	p
percentagem	0	2 (13,3%)	0 (0%)	< 0,001*
	1-10	10 (66,7%)	0 (0%)	
	11-25	1 (6,7%)	2 (15,4%)	
	26-50	2 (13,3%)	8 (61,5%)	
	>50	0 (0%)	3 (23,1%)	
intensidade	0	2 (13,3%)	0 (0%)	0,001*
	1	1 (6,7%)	0 (0%)	
	2	8 (53,3%)	0 (0%)	
	3	4 (26,7%)	13 (100%)	
padrão	Bas	12 (80%)	0 (0%)	< 0,001**
	BasExt	0 (0%)	7 (53,8%)	
	Infiltr	0 (0%)	3 (23,1%)	
	Dif	2(13,3%)	3 (23,1%)	
	Aus	0 (0%)	0 (0%)	

*Mann Whitney

**Teste Exato de Fisher

Figura 1

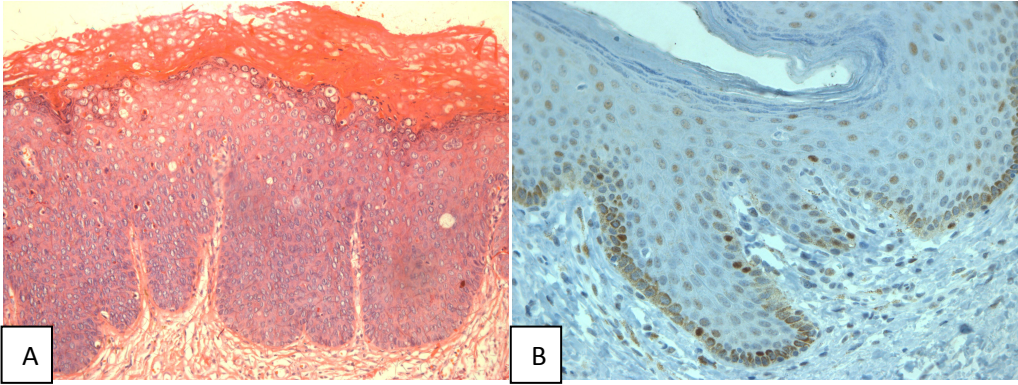


Figura 2

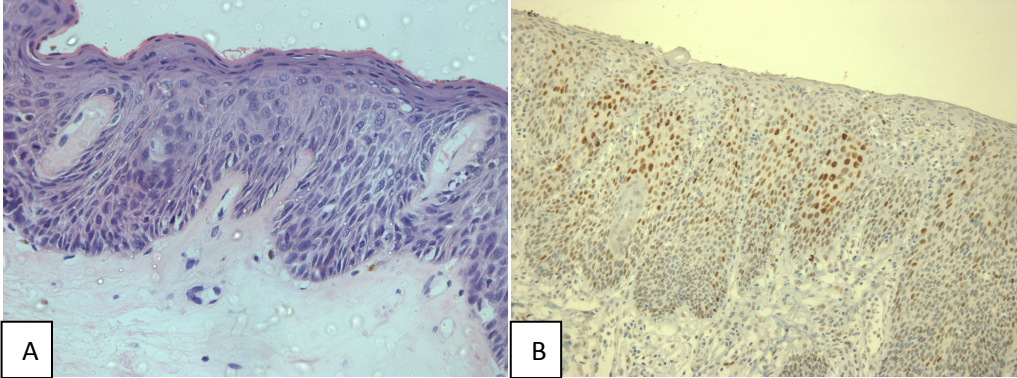


Figura 3

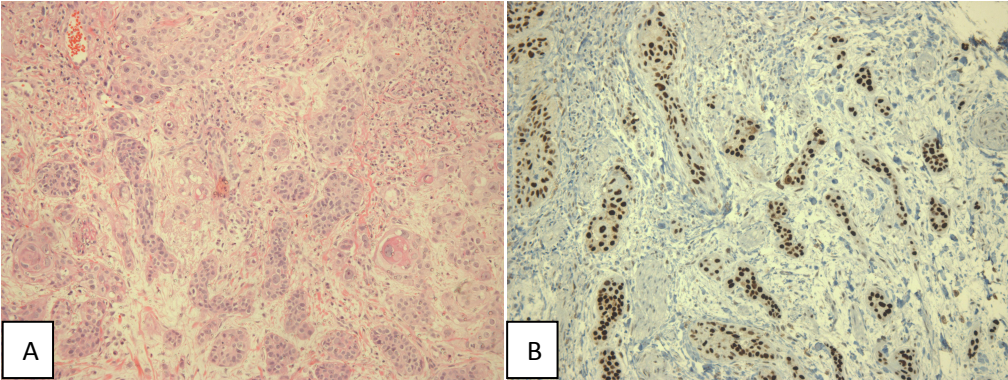
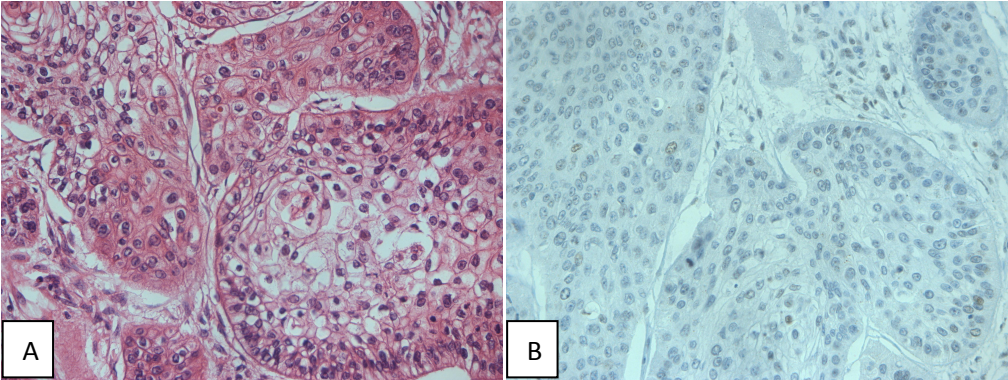


Figura 4



6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF VULVAR LESIONS BY PATHWAY OF CARCINOGENESIS

Raquel Camara Rivero¹, Deborah Garcia², Luciano Serpa Hammes³, Lúcia Maria Kliemann⁴, Edison Capp⁵

¹Master's Candidate, Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS School of Medicine. Staff pathologist, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

²Student, UFRGS School of Nursing.

³Superintendent for Education, Research and Social Responsibility, Hospital Moinhos de Vento.

⁴Professor, Department of Pathology, UFRGS School of Medicine. Preceptor, Medical Residency Program in Pathology, HCPA.

⁵Professor, Department of Obstetrics and Gynecology and Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS School of Medicine. Preceptor, Medical Residency Program in Gynecology, HCPA.

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar - Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: edcapp@ufrgs.br

ABSTRACT

Introduction: Invasive squamous cell carcinoma (SCC) of the vulva is a rare disease, accounting for approximately 3-5% of all malignant tumors of the female genital tract and for 90% of all primary vulvar neoplasms. Two pathways exist for the development of vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and vulvar SCC: a human papillomavirus (HPV)-independent pathway and an HPV-related pathway, with distinct clinical, pathological, and epidemiological characteristics. **Objective:** To study the two pathways of vulvar carcinogenesis and correlate immunohistochemical expression of p53 with histological findings. **Methods:** This case-control study included 76 cases. Patients were reclassified in accordance with the 2004 International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD) Terminology, followed by a review of clinical records and immunohistochemical staining for p53. **Results:** Overall, 26 cases were normal, 15 were in the HPV-associated pathway (12 cases of usual VIN and three of warty SCC), and 13 were in the HPV-independent pathway (5 cases of differentiated VIN and eight of keratinizing SCC). Significant differences in p53 expression were observed between the two pathways of carcinogenesis: in the HPV-independent pathway, the percentage of p53-positive cells was greater ($>25\%$, $p<0,001$), and the staining pattern was basal (extending into the middle layer) in differentiated VIN and diffuse or infiltrative in SCC ($p<0.001$). In the HPV-associated pathway, p53 staining was less extensive ($\leq 10\%$ of cells, $p<0.001$) and followed a basal pattern in usual VIN, whereas warty SCCs were negative for p53 ($p<0.001$). Age-related differences were also present ($p<0.05$): patients with HPV-independent disease had a mean age of 66 years, whereas those with HPV-associated disease had a mean age of 44. **Conclusion:** Unique patterns of histological appearance and p53 expression separate vulvar lesions into two distinct pathways of carcinogenesis. We propose that p53 immunohistochemistry should be performed simultaneously with histological examination in all cases of VIN and vulvar SCC, as it would aid in definition of the pathway of carcinogenesis and thus enable better clinical follow-up of patients with these conditions.

Keywords: squamous cell carcinoma of the vulva, vulvar intraepithelial neoplasia, human papillomavirus, p53, vulvar carcinogenesis, immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma (SCC) of the vulva is a rare disease, accounting for approximately 3-5% of all malignant tumors of the female genital tract and for 90% of all primary vulvar neoplasms (1). The incidence of vulvar SCC has been increasing in the United States (2) and Europe (3). The rate observed in Brazil is among the highest in the world, and the city of Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, is one of the state capitals with the largest number of cases (1). Vulvar carcinogenesis is not as directly associated with HPV as cervical carcinogenesis, which is approximately 100% HPV-mediated (4). Approximately 40% of vulvar SCCs are HPV-associated (5,6), and vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) is found adjacent to SCCs in 50-70% of cases (7). Strong evidence suggests that two distinct etiopathogenetic pathways exist for the development of VIN and vulvar SCC, one HPV-independent and one HPV-related (8,9), with different clinical, pathological, and epidemiological features (7). The HPV-independent pathway is found in older women and leads to keratinizing SCC, often against a background of *lichen sclerosus* and differentiated VIN. The HPV-associated pathway occurs in younger women, leads to basaloid or warty SCC, and is associated with usual VIN (8,9).

HPV-associated pathway – usual VIN: the epidermis is thickened, with hyper/parakeratosis, loss of cell maturation with nuclear atypia in all epithelial layers, multinucleation, and numerous mitotic cells, including atypical mitoses. Koilocytotic atypias may or may not be present. Involvement of the follicular epithelium of the skin appendages and melanophages in the papillary dermis are characteristic (7,10,11). Vulvar lesions showing HPV-related cytopathic changes and low-grade dysplasia correspond to *condyloma acuminata* and should be diagnosed as such, as they very rarely – if ever – progress to vulvar SCC (7).

HPV-associated pathway – basaloid and warty (condylomatous) invasive SCC: these cancers account for 40% of vulvar SCCs and approximately 80-90% are associated with HPV16 (10,12). Basaloid SCC features cells with a high nuclear-to-cytoplasmic ratio, cohesive growth, little keratinization, and pseudo-koilocytosis (7,10). Warty SCC is characterized by bulbous or irregular nests, frequent keratinization, and prominent koilocytotic changes (7).

HPV-independent pathway – differentiated VIN: accounts for 2-5% of all cases of VIN and affects older women than usual VIN, with a mean age of 67 years (13). Differentiated VIN is usually unifocal (9,14). The potential for progression of differentiated VIN appears greater than that of usual VIN (14), and it can progress quite rapidly to SCC (9). Differentiated VIN poses a diagnostic challenge (15,16); it is considered a precursor of keratinizing SCC (14) and most commonly diagnosed adjacent to it, continuous with *lichen sclerosus* (7). It features well-differentiated acanthotic epithelium, prominent intercellular bridges, and enlarged, hyperchromatic keratinocytes with vesicular nuclei, macronucleoli, and abundant, eosinophilic cytoplasm in the basal layer. There is elongation and anastomosis of the rete ridges, failure of maturation, spongiosis, hyperkeratosis, and parakeratosis (7,17).

HPV-independent pathway – keratinizing invasive SCC: associated with maturation and keratinization, keratin pearls, and absence of koilocytotic changes (7).

Immunohistochemical staining for p53: the genetic abnormality most commonly associated with cancer is a mutation in the *TP53* gene, which encodes the tumor suppressor protein p53 (18). A key player in the maintenance of genomic integrity, p53 is responsible for recognizing DNA damage and halting the cell cycle at phase G1 or G2 to enable repair. In response to stress, p53 becomes activated, which triggers phenotypic changes ranging from DNA repair through senescence to apoptosis (19). Inactivation of p53 is an important cell event in the process of carcinogenesis (20). The E6 oncoprotein of high-risk HPV binds to p53 and leads to p53 dysfunction, interfering with its ability to interrupt the cell cycle (9). HPV-infected cells exhibit low levels of p53 protein (21). Another mechanism involved in carcinogenesis is a p53 mutation with overexpression of mutant polypeptides, jeopardizing activity and inactivating the wild-type gene (22). Mutations often have oncogenic potential and an extended half-life, leading to accumulation of p53 in tumor cells, which is associated with loss of growth control and cellular immortalization (23). Immunohistochemical overexpression of p53 is synonymous with mutation, but not all mutations lead to p53 overexpression. In these cases, functional deletion may be the initial event. Immunohistochemical anti-p53 antibodies react both with wild-type and with mutant p53. Expression of p53 in normal vulvar

epithelium is low. Complete p53 negativity may be the result of true null mutations or of rapid degradation of HPV E6 protein-bound p53 (24); therefore, p53 expression is low or absent in the HPV-associated carcinogenesis pathway. In the HPV-independent pathway, p53 expression is greater due to intracellular buildup of the mutated protein (9). This marker can be used for confirmation of histological diagnosis (9).

The objective of the present study was to assess the two pathways of vulvar carcinogenesis by correlating immunohistochemical expression of p53 with histopathological findings and clinical data.

MATERIALS AND METHODS

Surgical specimens labeled as being from the anatomical region of the vulva and sent for histopathological examination at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Pathology Service between January 2007 and December 2011 were selected from the HCPA electronic medical records system. The charts for each selected case were reviewed for data such as patient age and presence of single or multiple lesions, the latter recorded as presence of noncontinuous lesions in the vulva, cervix, vagina, or perianal region. Cases were reviewed by a pathologist blinded to the original diagnosis and classified in accordance with the International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD) Terminology as follows: benign, *lichen sclerosus*, *condyloma acuminata*, usual VIN, differentiated VIN, keratinizing SCC, basaloid SCC, or warty SCC. Immunohistochemical staining for p53 was performed on all selected specimens. Cases of VIN and carcinoma were separated into two groups: HPV-associated pathway and HPV-independent pathway (5,7,9,12,14,25,26).

Sampling: the sample included cases of lichen sclerosus, condyloma acuminata, VIN, and SCC. Specimens with normal skin or minimal benign, unspecified changes were also included as controls. Cases with a diagnosis not related to the two vulvar carcinogenic pathways of interest – intradermal melanocytic nevus, melanoma, Bartholin's cyst, herpes vulvitis, vascular thrombosis, and

molluscum contagiosum – were excluded, as were specimens that did not yield sufficient material for immunohistochemical examination and those for which archived paraffin blocks were unavailable.

Immunohistochemistry (IHC): the mouse anti-p53 monoclonal antibody [BP53-12-1 clone] from Biogenex (Freemont, Canada) was used for manual immunohistochemical processing at the HCPA Research Center laboratory. New slices were obtained from the archived paraffin blocks, deparaffinized, hydrated in a graded ethanol series, and placed in phosphate-buffered saline solution. The antibody was diluted to a concentration of 1:50 and used after microwaving with sodium citrate buffer (pH 6.0, Merck, Germany) for 20 minutes blockade of endogenous peroxidase activity with 10% hydrogen peroxide for 10 minutes. The specimens were stained with the ABC (avidin-biotin complex) method and counterstained with Harris hematoxylin. Samples of p53-positive infiltrative ductal carcinoma of the breast were used as a positive control.

Interpretation of IHC findings: IHC findings were interpreted retrospectively and blindly to histopathological diagnosis, as proposed by Hantschmann et al. (24). The following parameters were employed for assessment of p53 staining: intensity, percentage of stained cells, and pattern of expression. Intensity of staining was assessed using the scale in Table 1. The percentage of positive cells was estimated by counting 200 cells and classified into subgroups of 0%, 1-10%, 11-25%, 26-50%, and >50% (24). The pattern of p53 staining was characterized as diffuse, basal, or infiltrative, again as proposed by Hantschmann et al. (24)

Statistical analysis: the results were entered into Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) spreadsheets. Data were analyzed in IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corporation, Armonk, NY). The distribution of diagnoses and agreement between original and revised diagnoses were expressed as descriptive statistics (percentages and means). The Kruskal–Wallis test was used to assess p53 staining intensity and percentage of p53-positive cells. Between-group comparisons were then carried out by means of the Bonferroni–Dunn method. A Z-test with Bonferroni correction was used for multiple comparisons. For comparative statistical analysis of the two pathways of vulvar carcinogenesis, the *t*-test was used for analysis of patient age, whereas Fisher’s exact test was used for comparison of

single versus multiple lesions. Fisher's test was also used for analysis of p53 staining patterns, and the Mann–Whitney *U* test for assessment of percent staining intensity. The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Overall, 162 cases were identified between 2007 and 2011. Of these, 12% (n=20) were originally diagnosed as SCC, 17% (n=28) as low-grade squamous intraepithelial lesions (including *condyloma acuminata*), 11% (n=18) as high-grade VIN, 1% (n=2) as melanoma, 28% (n=45) as specific benign lesions (including lichen sclerosis, herpes, *molluscum contagiosum*, Bartholin's cyst, etc.), and 29% (n=46) as nonspecific benign lesions, and 1% as unchanged normal mucosa. Only 1% of specimens (n=2) yielded insufficient material for diagnosis.

A total of 76 specimens, obtained from 72 patients with a mean age of 52 ± 19 years (range, 17–82 years), were selected for the purposes of this study.

SCC accounted for 90% of all vulvar malignancies in the HCPA sample, which is consistent with the literature (7). The nomenclature used by Brazilian pathologists is heterogeneous; the same criteria used for diagnosis of cervical lesions are employed for assessment of invasive neoplasms and intraepithelial lesions of the vulva. Overall agreement with the nomenclature after review and application of the ISSVD classification was 57.9%; in diagnoses of VIN and SCC, there was 0% agreement. After separating cases as benign or malignant, without taking nomenclature into account, there was 94.7% agreement regarding morphological criteria for dysplasia and invasion.

Overall, 25 cases of benign, nonspecific lesions were diagnosed (34% of total). Patient age ranged from 30 to 82 years (mean, 55 ± 16 years). There was disagreement with one histological diagnosis, which was originally labeled as low-grade squamous intraepithelial lesion and revised to a diagnosis of benign lesion. This case was negative for p53. Of the remaining cases, 85% had p53 expression in up to 10% of cells (n=22); of these, seven were negative and 15 had 1-10% of cells positive for p53. All cases with $\leq 10\%$ positivity had a basal staining pattern. Four cases had a staining intensity of 3, an extensive staining pattern and $>26\%$ positive cells ($>50\%$ in two cases).

Eight cases of *lichen sclerosus* were identified, accounting for 12% of all diagnoses. There was no diagnostic disagreement. Mean patient age was 61 ± 15 years and all patients had a single lesion. Immunohistochemical staining showed a basal pattern and up to 10% positive cells in seven of eight cases (87.5%); one case was negative for p53. Staining intensity was grade 2 in five of the eight cases and grade 3 in the remaining three cases.

A total of 15 cases of vulvar *condyloma acuminata* were diagnosed, accounting for 20% of all diagnoses, and with a diagnostic agreement rate of 93%. Mean patient age was 38 ± 16 years. On chart review, 13 patients had a detailed description of clinical and gynecological features, and nine (69%) had a history of multiple genital lesions, whereas four (31%) had single lesions. Staining for p53 had a basal pattern in 100% of specimens, and the percentage of p53-positive cells was 10% or less in 93% of cases. Staining intensity was grade 1 in five cases (33%), grade 2 in eight cases (53%), and grade 3 in two cases (13%).

Seventeen cases of VIN were diagnosed, accounting for 22% of all diagnoses. Of these, 12 were diagnosed only after review of specimens (16% of all cases and 71% of VINs). Mean patient age was 45 ± 17 years, 67% (n=8) had single lesions, 25% (n=3) had multiple lesions, and 8% (n=1) had no available data on number of lesions. All cases were originally diagnosed as high-grade squamous intraepithelial lesions (VIN 3), which led to a 100% rate of disagreement with the latest nomenclature, despite agreement with the criteria for diagnosis of dysplasia. Staining for p53 was restricted to the basal layer in 100% of specimens. Staining intensity was grade 2 in 75% of cases (n=9), grade 3 in 17% (n=2), and grade 1 in 8% (n=1) (Table 2). The percentage of p53-positive cells was 10% or less in 75% of cases (n=9), up to 25% in 17% of cases (n=2), and up to 50% in only 8% of cases (n=1) (Figure 1).

Five cases of differentiated VIN were diagnosed after review of specimens (6% of all diagnoses and 29% of VINs) (Figure 2). Three cases had originally been diagnosed as VIN 3, whereas two were identified in the margins of a keratinizing SCC, on a background of lichen sclerosus. Originally, the ISSVD term “differentiated VIN” was not used in any cases (100% disagreement with the nomenclature). Mean patient age was 57 ± 22 years. On immunohistochemical assessment, 100% of

cases had p53 staining extending suprabasally, strong staining intensity, and a high percentage of positive cells (26-50%).

Eleven cases of SCC were diagnosed, accounting for 14% of all diagnoses. The ISSVD proposed nomenclature was not used in any case, but there was no disagreement with the latest criteria for malignancy. Of the 11 cases of SCC, eight were classified as keratinizing SCC (Figure 3), which thus accounted for 73% of all carcinomas and 10% of all diagnoses. Mean patient age was 75 ± 5 years and all patients had single lesions. Three cases has comorbid differentiated VIN, and two of these had adjacent *lichen sclerosus* as well. All were positive for p53 with maximum staining intensity and at least 10% positive cells; in 75% of cases (n=6), over 26% of cells were positive. The staining pattern was never basal, and the diffuse or infiltrating patterns were found in 75% of cases.

Three cases of warty (condylomatous) SCC were diagnosed (Figure 4), thus accounting for 27% of SCCs and 4% of all diagnoses. Mean patient age was 44 ± 20 years and 67% of specimens (n=2) were negative for p53. The sole positive specimen had a small percentage of stained cells (<10%). No cases of basaloid SCC were diagnosed in the study sample.

By stratifying cases of VIN and SCC into the HPV-associated and HPV-independent pathways, we found 15 cases in the former and 13 cases in the latter. In the HPV-associated pathway, the mean patient age was 44 ± 16 years, versus 66 ± 16 years in the HPV-independent pathway ($p < 0.05$). There were no differences between the pathway in the number of lesions (single or multiple) ($p = 0.341$) (Table 3).

Assessment of p53 expression in the HPV-associated and HPV-independent pathways showed a significant difference in staining intensity: 100% of cases in the HPV-independent pathway had a staining intensity of 3 ($p = 0.001$). Differences were also observed in percentage of p53-positive cells, with >26% positivity most common in the HPV-independent pathway and low percentages (0-10%) related to the HPV-associated pathway ($p < 0.001$). A basal pattern of staining was significantly associated with the HPV pathway, whereas the suprabasal and diffuse staining

patterns were significantly associated with the HPV-independent pathway ($p < 0.001$) (Table 4).

DISCUSSION

This study analyzed the two pathways of vulvar carcinogenesis by correlating immunohistochemical expression of p53 with histopathological findings and clinical data. There were no false-negative diagnoses of high-grade dysplasia or malignancy among the cases determined to be benign. Expression of p53 was consistent with that expected for normal skin as reported in the literature (24), with weak staining, a basal pattern, and up to 10% p53-positive cells. This staining corresponds to the wild-type, unmutated p53 protein present in normal epithelium, predominantly in the mitotically active basal layer (24). In four cases in this group (16%), immunohistochemical analysis revealed maximum intensity of p53 expression, staining extending beyond the basal layer, and a high percentage of p53-positive cells. A chart review showed that these patients had simultaneous vulvar carcinoma in another location or a previous history of vulvar carcinoma. This finding strengthens the hypothesis that p53 mutations play an important role in vulvar carcinogenesis (27), and suggests that the presence of such mutation may be associated with a risk of developing vulvar cancer (24), an association that has yet to be confirmed.

After a review of slides, all original diagnoses of *lichen sclerosus* were confirmed, and two additional cases, observed in the margins of keratinizing SCC amid differentiated VIN, were identified. As reported in the literature (28), mean patient age was 61 ± 15 years and all had single lesions. There were no reports of “figure-of-eight” lesions involving the *labia minora* and anus as noted elsewhere, and comorbid extragenital involvement – reported as occurring in up to 20% of cases (28) – was not identified in our sample. The percentage of p53-positive cells never exceeded 10%, whereas in the literature, this percentage has been reported as 30% (29). A previous study also demonstrated that immunohistochemical staining was restricted to the basal layer, with 25% of cases being altogether negative for p53 (24), whereas in our sample, only 12.5% of cases were p53-negative. According to the literature (29), DNA aneuploidy correlates with high p53 expression. Therefore, low expression is indicative of a nonmutated p53 pattern in *lichen sclerosus*, which has yet to be confirmed by DNA microdissection.

Among the original diagnoses, one case was diagnosed as VIN 1, a classification that should be abandoned (7). This diagnosis was revised and deemed benign, and the specimen was p53-negative. Most of the remaining cases of low-grade changes with koilocytotic atypias were diagnosed as *condyloma acuminata*, except for two cases given the descriptive diagnosis of “squamous papilloma of viral etiology”. Descriptive diagnosis is not recommended by any of the sources reviewed for this purpose (14,25); therefore, despite being morphologically correct (these cases, for instance, were classified not as diagnostic disagreement, but as noncompliance with the nomenclature), this practice should be discouraged. Among these specimens, 100% had a basal pattern of p53 expression, 93% had 10% p53-positive cells or less, and 53% had grade 2 staining intensity. This is consistent with what would be expected of an HPV-associated lesion (24).

Usual VIN was detected in patients with a mean age of 45 ± 17 years, which is consistent with the mean age described in the literature (40 years) (10). Approximately 40% of patients reported in the literature have multicentric disease, whereas in the sample reported herein, 25% of patients had involvement of other sites of the genital tract (10).

Differentiated VIN accounted for 6% of all cases in our sample; mean age was 57 ± 22 years and single lesions were predominant, which is consistent with the literature (13,14). We could not assess whether the clinical appearance corresponded to the limited area of skin involved, as described in the literature (9), because no information on lesion size was available from patients' electronic medical records. In the present study, 40% of differentiated VINs were found adjacent to SCC margins, as reported in a previous study (13). All cases of SCC associated with differentiated VIN were of the keratinizing type, as expected, since VIN is considered a precursor of this specific subtype of vulvar SCC (14). Differentiated VIN has received little attention from pathologists (16); accordingly, none of the cases detected in this sample had originally been diagnosed as such. Only five cases were identified after a review of slides, which confirms the rarity of this diagnosis. As well as posing a diagnostic challenge on histopathological examination, differentiated VIN has a very brief intraepithelial phase, progressing quickly to invasive carcinoma, which would further hinder its detection (16,17). In cases associated with keratinizing SCC, concomitant occurrence of differentiated VIN and lichen sclerosus has also

been observed (7,9,10) The hypothesis that differentiated VIN is often misdiagnosed as benign changes or even as normal epithelium (15,16) was not borne out in this study, as the patients with this condition had originally received a diagnosis of grade 3 VIN. A recent review (30) assessed 60 cases diagnosed as *lichen sclerosus* progressing to SCC (minimum 10-year follow-up), 42% of which (25 of 60) were reclassified as differentiated VIN. The absence of cases of *lichen sclerosus* reclassified as differentiated VIN in the present sample may be due to the small sample size. Differentiated VIN was associated with suprabasal extension and a high percentage of p53 positivity, whereas usual VIN was associated with a basal staining pattern and a low percentage of positive cells ($p < 0.05$), which is in agreement with the literature (7).

The mean age of patients with warty SCC was 44 ± 20 years, and that of patients with keratinizing SCC ($p < 0.05$), 66 ± 5 years, which was consistent with the literature (8,9). The HPV-associated pathway was expected to account for approximately 40% of SCCs (12); the actual figure in our sample was 27%. Furthermore, two of the three patients with warty SCC had multicentric lesions, with concomitant cervical lesions. As expected, keratinizing carcinoma accounted for most cases of SCC (12).

CONCLUSIONS

Comparison of diagnoses of VIN and vulvar SCC shows that these conditions can be separated by histological findings, immunohistochemistry, and by significantly different distributions of patient age at diagnosis into two pathways of carcinogenesis. Hence, stratification of cases by pathway of carcinogenesis can easily be accomplished in the daily practice of the clinical pathology laboratory by incorporating routine use of p53 staining simultaneously with histological diagnosis for all cases of VIN and vulvar SCC.

The findings presented herein confirm the paradox (6,7,11) that most precursor lesions are in the HPV-associated pathway, whereas most SCCs belong to the HPV-independent pathway. This low incidence of carcinomas in the HPV-associated pathway, despite the large number of precursor lesions, might be explained by a more liberal use of biopsy, which would contribute to early diagnosis

and treatment of lesions that would otherwise progress to SCC (13). Another relevant factor is the ease of establishing a histological diagnosis of usual VIN as compared with differentiated VIN.

Better characterization of premalignant and malignant vulvar lesions is possible and could improve clinical follow-up, making it more patient-specific by stratifying cases into risk groups defined by a better understanding of vulvar carcinogenesis. Immunohistochemical assessment of p53 expression performed simultaneously with histological diagnosis of VIN and SCC should be a routine component of the diagnostic workup for all patients in whom these conditions are suspected, as it would help establish a definitive diagnosis.

REFERENCES

1. Nogueira MC, Guedes Neto EDP, Rosa MW, Zettler E, Zettler CG. Immunohistochemical expression of p16 and p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva. *Pathology oncology research POR* [Internet]. 2006;12(3):153–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16998595
2. Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer causes & control: CCC* [Internet]. 2009 Nov [cited 2013 Apr 14];20(9):1779–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2868506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-2007-a nationwide population-based study. *Gynecologic Oncology* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;122(1):45–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474166>
4. Van De Nieuwenhof HP, Van Kempen LCLT, De Hullu JA, Bekkers RLM, Bulten J, Melchers WJG, 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* [Internet]. 2009;18(7):2061–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19567503

5. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2013 Mar 27];124(7):1626–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19115209>
6. Scurry J, Champion M, Scurry B, Kim SN, Hacker N. Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2006/04/25 ed. 2006;25(2):176–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633069>
7. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Jan [cited 2013 Apr 14];62(1):161–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190170>
8. Van Der Avoort IAM, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JMM, De Hullu JA, De Wilde PCM, et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* [Internet]. 2006;25(1):22–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0004347-200601000-00002>
9. Hoevenaars BM, Van der Avoort IAM, De Wilde PCM, Massuger LFAG, Melchers WJG, De Hullu JA, 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* [Internet]. 2008 Dec 15 [cited 2013 Mar 9];123(12):2767–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798277>
10. Crum, C.P., M.R. Nucci and KRL. *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology*. Elsevier Health Sciences.; 2011.
11. Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *International journal of gynecological pathology official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* [Internet]. 2001;20(1):16–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11192069>
12. De Koning MNC, Quint WG V, Pirog EC. Prevalence of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in different histologic subtypes of vulvar carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008;21(3):334–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192968>
13. Van De Nieuwenhof HP, Van Der Avoort IAM, De Hullu JA. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Critical reviews in oncologyhematology*

- [Internet]. 2008;68(2):131–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406622>
14. Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. *J Skin Cancer* [Internet]. 2010/12/29 ed. 2011;2011:951250. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188235>
 15. Yang B, Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *The American journal of surgical pathology* [Internet]. 2000;24(3):429–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10716158
 16. Fox H, Wells M. Recent advances in the pathology of the vulva. *Histopathology* [Internet]. 2003;42(3):209–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12605639>
 17. Van De Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, Van Der Zee AGJ, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;24(2):297–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057461>
 18. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Apr 16];28(6):622–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311302>
 19. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation* [Internet]. 2003 Apr [cited 2013 Feb 28];10(4):431–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719720>
 20. Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M, et al. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* [Internet]. 1991 Oct [cited 2013 Apr 21];6(10):1785–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717923>
 21. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* [Internet]. 1990 Dec [cited 2013 Apr 21];63(6):1129–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867490904098>

22. Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* [Internet]. [cited 2013 Apr 21];329(6136):219–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2442619>
23. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and cellular biology* [Internet]. 1988 Feb [cited 2013 Apr 21];8(2):531–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=363177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Hantschmann P, Sterzer S, Jeschke U, Friese K. P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosus. *Anticancer Research* [Internet]. 2005;25(3A):1739–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033093>
25. Scurry J, Wilkinson EJ. Review of terminology of precursors of vulvar squamous cell carcinoma. *J Low Genit Tract Dis* [Internet]. 2006/07/11 ed. 2006;10(3):161–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829756>
26. Heller DS. Report of a new ISSVD classification of VIN. *Journal of lower genital tract disease* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Apr 14];11(1):46–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194951>
27. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, 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* [Internet]. 2003 Sep [cited 2013 Feb 28];90(3):547–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678722>
28. Monsálvez V, Rivera R, Vanaclocha F. [Lichen sclerosus]. *Actas dermatosifiliográficas* [Internet]. [cited 2013 Apr 22];101(1):31–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109390>
29. Van der Avoort IAM, Van de Nieuwenhof HP, Otte-Höller I, Nirmala E, Bulten J, Massuger LFAG, et al. High levels of p53 expression correlate with DNA aneuploidy in (pre)malignancies of the vulva. *Human pathology* [Internet]. 2010 Oct [cited 2013 Apr 24];41(10):1475–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656324>
30. Van de Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, Van der Zee AGJ, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [Internet]. 2011 Feb [cited 2013 Apr 22];24(2):297–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057461>

Figure Legends

Table 1. Intensity of p53 staining.

Table 2. Patterns of p53 expression in the examined lesions. Basal/Ext: basal pattern of expression extending into the middle layer.

Table 3. Distribution of the number of lesions by pathway of carcinogenesis.

Table 4. Distribution of p53 expression patterns by pathway of carcinogenesis. Basal/Ext: basal pattern of expression extending into the middle layer.

Figure 1. Usual VIN. A) Dysplasia, characterized by failure of maturation and atypias in two-thirds of the epithelium. H&E stain, 100x original magnification. B) Basal staining. p53 stain, 100x original magnification.

Figure 2. Differentiated VIN. A) Atypias, spongiosis, and fusion of rete ridges. H&E stain, 100x original magnification. B) Immunohistochemical staining showing suprabasal extension. p53 stain, 100x original magnification.

Figure 3. Keratinizing squamous cell carcinoma. A) Carcinomatous nests invading the stroma. H&E stain, 100x original magnification. B) Diffuse p53 expression in the invasive nests. p53 stain, 100x original magnification.

Figure 4. Warty squamous cell carcinoma. A) Koilocytotic atypias in a background of invasive disease. H&E stain, 400x original magnification. B) Absence of p53 expression. p53 stain, 100x original magnification.

Table 1

Staining	Intensity
None	zero
Weak	1
Medium	2
Strong	3

Table 2

	p53	VIN, usual	VIN, differentiated	SCC, keratinizing	SCC, warty	p-value
percentage	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)	< 0.001*
	1-10	9 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)	
	11-25	1 (8.3%)	0 (0%)	2 (25%)	0 (0%)	
	26-50	2 (16.7%)	5 (100%)	3 (37.5%)	0 (0%)	
	>50	0 (0%)	0 (0%)	3 (37.5%)	0 (0%)	
intensity	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)	0.001*
	1	1 (8.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	2	7 (58.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1(33.3%)	
	3	4(33.3%)	5 (100%)	5 (100%)	0 (0%)	
	Basal	12(100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
pattern	Basal/Ext.	0 (0%)	5 (100%)	2 (25%)	0 (0%)	< 0.001**
	Infiltrative	0 (0%)	0 (0%)	3 (37.5%)	0 (0%)	
	Diffuse	0 (0%)	0 (0%)	3 (37.5%)	1 (33.3%)	
	Absent	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)	

* Kruskal-Wallis

** Fisher's exact test

Table 3

	HPV-associated pathway	HPV-independent pathway	p-value
Single lesion	9 (60%)	9 (69%)	0.0341*
Multiple lesions	5 (33%)	1 (8%)	
No data on number of lesions	1 (7%)	3 (23%)	

* Fisher's exact test

Table 4

	p53	HPV-associated	HPV-independent	p
percentage	0	2 (13.3%)	0 (0%)	< 0.001*
	1-10	10 (66.7%)	0 (0%)	
	11-25	1 (6.7%)	2 (15.4%)	
	26-50	2 (13.3%)	8 (61.5%)	
	>50	0 (0%)	3 (23.1%)	
intensity	0	2 (13.3%)	0 (0%)	0.001*
	1	1 (6.7%)	0 (0%)	
	2	8 (53.3%)	0 (0%)	
	3	4 (26.7%)	13 (100%)	
pattern	Basal	12 (80%)	0 (0%)	< 0.001**
	Basal/Ext.	0 (0%)	7 (53.8%)	
	Infiltrative	0 (0%)	3 (23.1%)	
	Diffuse	2(13.3%)	3 (23.1%)	
	Absent	0 (0%)	0 (0%)	

*Mann–Whitney U

**Fisher's exact test

Figure 1

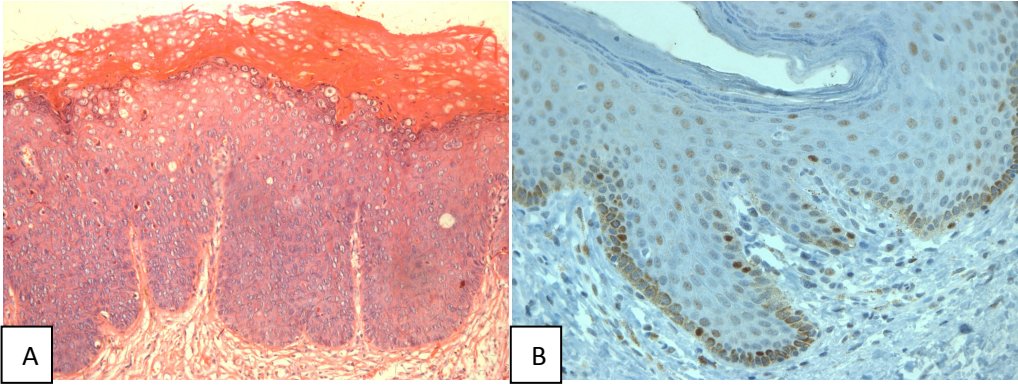


Figure 2

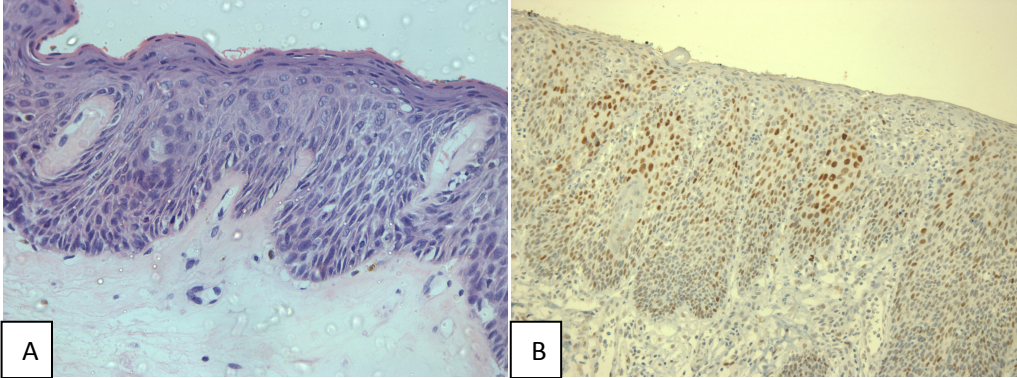


Figure 3

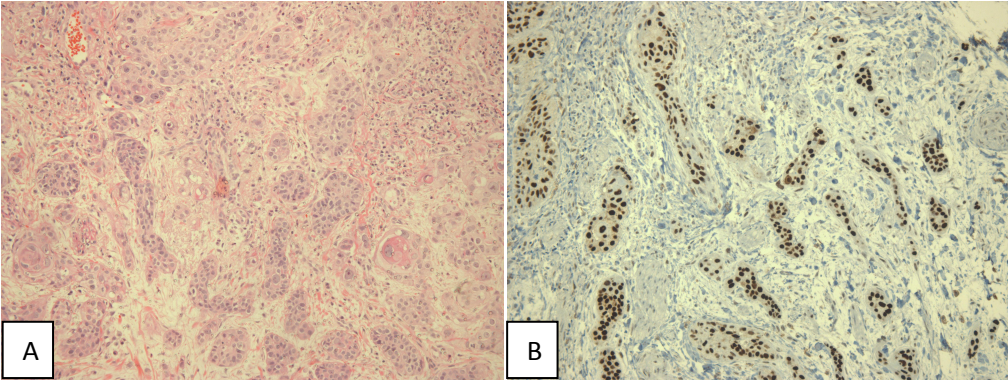
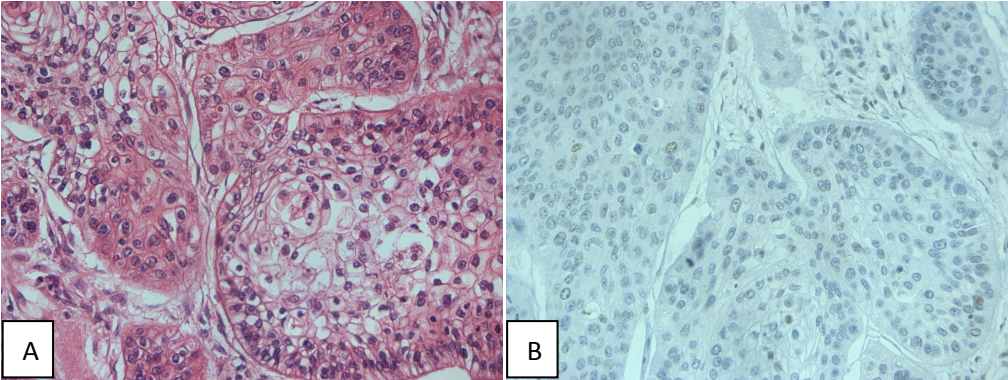


Figure 4



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Unindo-se os achados imuno-histoquímicos com aspectos histopatológicos e dados clínicos, confirma-se o esperado na literatura: existe um padrão característico que separa as lesões vulvares em duas vias carcinogênicas distintas. Essa diferenciação observada na amostra dos casos do Serviço de Patologia do HCPA evidencia que os achados da literatura mundial são reproduzíveis em nosso meio e a separação das vias carcinogênicas pode ser feita de forma simples, fácil e rápida, podendo ser realizada no dia a dia do laboratório. Para tanto, não são necessários novos recursos além daqueles já existentes: histologia, informações clínicas e teste imuno-histoquímico com anticorpo já disponível e de amplo uso.

É necessário, porém, um treinamento dos patologistas do Serviço apenas quanto ao uso dos critérios propostos para utilização da classificação morfológica da ISSVD, já que não foi observada após revisão nenhuma falha significativa quanto aos diagnósticos morfológicos gerais de benignidade, inflamação crônica, displasia e invasão.

Propomos o uso rotineiro do p53 simultâneo ao diagnóstico histológico em todos os casos de NIV e CE, pois isso auxiliaria na definição da via carcinogênica.

Uma caracterização mais adequada das lesões vulvares pré-malignas e malignas é possível e poderia melhorar o acompanhamento clínico, tornando-o mais específico para cada paciente ao separá-las em grupos de risco através do melhor entendimento do seu processo carcinogênico. Estratégias para fortalecer essa caracterização poderiam incluir ainda a detecção da presença do HPV pelo teste de CISH, o que pretendemos estudar nos nossos casos num próximo trabalho. Além disso, permanece a necessidade da realização de estudos prospectivos de longo prazo associados a microdissecção e análise do DNA para detectar a presença de mutação do p53 em epitélio vulvar não neoplásico com alterações benignas inespecíficas e/ou doença inflamatória crônica, e se esse achado pode significar fator de risco para desenvolvimento de carcinoma epidermoide.