

**DIANA ELICI SADER ENGELMAN**

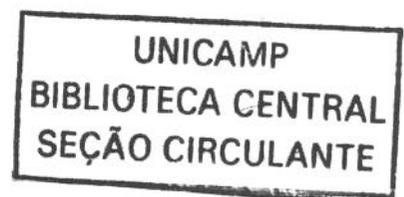
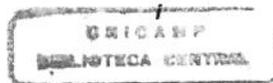
Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Anatomia Patológica.

Campinas, 11 de outubro de 2001.

Prof. Dr. José Vassallo   
Orientador

**ASSOCIAÇÃO DE NEOPLASIA ESCAMOSA INTRAEPITELIAL E  
INVASIVA DA VULVA À INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS  
HUMANOS E À IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA p53.**

**CAMPINAS  
2001**



**DIANA ELICI SADER ENGELMAN**

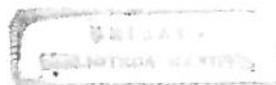
**ASSOCIAÇÃO DE NEOPLASIA ESCAMOSA INTRAEPITELIAL E  
INVASIVA DA VULVA À INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS  
HUMANOS E À IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA p53.**

**Tese de doutorado apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Doutor em  
Ciências Médicas, na área de concentração de  
Anatomia Patológica.**

**ORIENTADOR : Prof. Dr. JOSÉ VASSALLO  
CO-ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE**

**CAMPINAS  
2001**

iii



2002.01664

UNIDADE BC  
N.º CHAMADA:  
T/ UNICAMP  
En32a  
V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 47258  
PROC. 16-837102  
C  D   
PREC. R\$ 11,00  
DATA 16/01/06  
N.º CPD \_\_\_\_\_

CM00162849-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

En32a Engelman, Diana Elici Sader  
Associação de neoplasia escamosa intraepitelial e invasiva da vulva à infecção por papilomavírus humanos e à imunodeteção da proteína p53 / Diana Elici Sader Engelman. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : José Vassallo, Liliana Aparecida Lucci de Ângelo Andrade

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma . 2. Vulva. 3. Vírus do papiloma. 4. Genes. I. José Vassallo. II. Liliana Aparecida Lucci de Ângelo Andrade. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

---

---

**Orientador: Prof. Dr. José Vassallo**

---

---

### Membros:

---

1. Prof. Dr. Verônica Cavanini Ferreira Alves - USP/SP
  2. Prof. Dr. Roberto Pinto Paes - Sta. Casa/SP
  3. Prof. Dr. Geni de Paula Neves Jorge - FCM/UNICAMP
  4. Prof. Dr. Marcelo Alvarenga - FCM/UNICAMP
  5. Prof. Dr. José Vassallo - FCM/UNICAMP
- 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data:** 11.10.2001

---

## DEDICATÓRIA

---

*Ao meu pai, **Luiz**, exemplo de vida, que orienta o meu caminho. Agradeço a Deus por ter tido a felicidade de ser “uma das escolhidas” para ser sua filha.*

*Ao meu marido, **Inácio**, meu “porto-seguro”. Sem você, com certeza, eu não teria conseguido!*

*Aos meus filhos, **Luiz Henrique e Érica**, espero poder recompensá-los algum dia, de alguma forma, a minha ausência sentida e orientá-los com mais afinco nas suas trajetórias de vida.*

*Aos meus irmãos, **Luiz Arthur, Cristina e André**, que Deus nos mantenha sempre unidos ...*

*À minha mãe, Robyn, saudade imensa!...*

*Our mothers depart from us,  
gently depart on tiptoe,  
but we sleep soundly, stuffed with food,  
and fail to notice this dread hour.  
Our mothers do not leave us suddenly,*

*no -*

*it only seems so "sudden".  
Slowly they depart, and strangely,  
taking short steps down the stairs of life.  
One year, nervously remembering,  
we make a fuss to mark their birthday,  
but this belated zeal,  
will not save their souls,*

*or ours.*

*They move further away,*

*keep moving away.*

*Roused from our sleep,*

*we stretch toward them,*

*but our hands strike the air –  
a wall of glass has grown up there!  
We are too late.*

*The dread hour has struck.*

*Suppressing tears, we watch our mothers,  
pillars austere and still,  
departing from us.*

**Yevgeny Yevtushenko**

*“Ao meu mestre, com carinho”, Dr. José Vassallo, pelo seu otimismo e incentivo e sobretudo, pela amizade sincera que nos une. Muito obrigada !*

## AGRADECIMENTOS

---

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade, por sua presença tranqüila e ajuda inestimável nos momentos difíceis.

À Dr.<sup>a</sup>. Ingrid Amstalden, que veio em meu auxílio, sem medir esforços, em um período conturbado da minha vida.

À Áurea Tiekko Kikuchi Ueno, por ter “assumido” o nosso Laboratório durante todos estes anos e sobretudo, pela sua paciência.

À minha cunhada Mirian Engelman, por ter cedido um pouco do seu precioso tempo em um período em que estava sobrecarregada de trabalho, para me auxiliar na digitalização das imagens.

À Glauce Aparecida Pinto, presença imprescindível.

Às técnicas, Fernanda de Oliveira e Wanda Vreck, pela imensa colaboração na preparação do material utilizado neste trabalho.

À Marisa de Almeida Matsura, grande colaboradora na realização das técnicas especiais.

À secretária Maria do Carmo Machado da Silva, pelo prestimoso auxílio durante a pós-graduação, sempre disponível e sorridente.

À Eliani Guelli e em especial, à Lusane Leão Baia, do Departamento de Estatística da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP.

Por fim, a todos que de uma maneira ou outra estiveram próximos durante este período difícil.

*Muito obrigada!*

# SUMÁRIO

---

|  |       |
|--|-------|
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | xix   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | xxi   |
| <b>RESUMO</b> .....  | xxiii |
| <b>I. INTRODUÇÃO</b> .....   | 25    |
| 1. GENE SUPRESSOR TUMORAL P53 .....  | 31    |
| 1.1. P53 e neoplasia cervical .....  | 33    |
| 1.2. P53 e prognóstico .....   | 37    |
| 2. PATOGÊNESE VIRAL ASSOCIADA À NEOPLASIA CERVICAL .....                           | 40    |
| 2.1. Fatores virais .....  | 43    |
| 2.2. Fumo .....  | 46    |
| 2.3. Infecções associadas .....  | 46    |
| 2.4. Hormônios .....   | 46    |
| 2.5. Imunidade .....   | 47    |
| 2.6. Oncogenes .....   | 47    |
| <b>II. OBJETIVOS DO TRABALHO</b> .....   | 49    |
| <b>III. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....   | 51    |
| 1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS .....  | 51    |
| 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA .....  | 56    |
| 3. HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR <i>IN SITU</i> .....                                     | 57    |
| 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 58    |
| <b>IV. RESULTADOS</b> .....  | 59    |
| 1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III .....                                  | 59    |
| 1.1. Distribuição etária .....   | 60    |
| 1.2. Etnia .....   | 60    |
| 1.3. Tipo de cirurgia realizada .....  | 60    |
| 1.4. História de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior ..... | 61    |
| 1.5. Aspecto macroscópico das lesões .....   | 62    |
| 1.6. Localização das lesões .....  | 63    |
| 1.7. Focalidade das lesões .....   | 63    |
| 1.8. Variantes histológicas .....  | 64    |
| 1.9. Sinais histológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humanos .....    | 66    |
| 1.10. Extensão para os anexos cutâneos .....                                       | 68    |
| 1.11. Alterações epiteliais adjacentes às lesões de NIV III .....                  | 68    |
| 1.12. Detecção do antígeno viral através da imuno-histoquímica .....               | 69    |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.13. Detecção do DNA viral através da hibridização molecular <i>in situ</i> .....  | 72        |
| 1.14. Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular <i>in situ</i> para a detecção dos papilomavírus humanos ..... | 76        |
| 1.15. Detecção da proteína p53 através da imuno-histoquímica .....  | 77        |
| <b>2. CARCINOMA SUPERFICIALMENTE INVASIVO DA VULVA</b> .....  | <b>80</b> |
| 2.1. Distribuição etária .....  | 81        |
| 2.2. Etnia .....  | 81        |
| 2.3. Tipo de cirurgia realizada .....   | 81        |
| 2.4. História de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior .....  | 82        |
| 2.5. Aspecto macroscópico das lesões .....  | 83        |
| 2.6. Localização das lesões .....   | 83        |
| 2.7. Focalidade das lesões .....  | 84        |
| 2.8. Profundidade de invasão .....  | 84        |
| 2.9. Sinais histológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humanos .....   | 85        |
| 2.10. Extensão para os anexos cutâneos .....  | 86        |
| 2.11. Alterações epiteliais adjacentes ao carcinoma superficialmente invasivo .....   | 86        |
| 2.12. Metástases ganglionares .....   | 86        |
| 2.13. Detecção do antígeno viral através da imuno-histoquímica .....  | 86        |
| 2.14. Detecção do DNA viral através da hibridização molecular <i>in situ</i> .....  | 87        |
| 2.15. Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular <i>in situ</i> para a detecção dos papilomavírus humanos ..... | 88        |
| 2.16. Detecção da proteína p53 através da imuno-histoquímica .....  | 89        |
| <b>3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO VULVAR</b> .....  | <b>91</b> |
| 3.1. Distribuição etária .....  | 92        |
| 3.2. Etnia .....  | 93        |
| 3.3. Tipo de cirurgia realizada .....   | 93        |
| 3.4. História de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior .....  | 94        |
| 3.5. Aspecto macroscópico das lesões .....  | 95        |
| 3.6. Localização das lesões .....   | 95        |
| 3.7. Focalidade das lesões .....  | 96        |
| 3.8. Variantes histológicas .....   | 97        |
| 3.9. Profundidade de invasão .....  | 100       |
| 3.10. Sinais histológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humanos .....  | 101       |
| 3.11. Alterações epiteliais adjacentes ao carcinoma invasivo .....  | 103       |
| 3.12. Metástases ganglionares.....  | 108       |
| 3.13. Detecção do antígeno viral através da imuno-histoquímica .....  | 110       |
| 3.14. Detecção do DNA viral através da hibridização molecular <i>in situ</i> .....  | 112       |
| 3.15. Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular <i>in situ</i> para a detecção dos papilomavírus humanos ..... | 113       |

|  |            |
|--|------------|
| 3.16. Detecção da proteína p53 através da imuno-histoquímica .....                 | 114        |
| 3.17. Pacientes com recidiva da neoplasia .....                                    | 118        |
| <b>4. ASSOCIAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DOS TRÊS GRUPOS DE PACIENTES .....</b>      | <b>119</b> |
| 4.1. Distribuição etária .....   | 120        |
| 4.2. Etnia .....   | 122        |
| 4.3. Tipo de cirurgia realizada .....  | 122        |
| 4.4. História de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior ..... | 123        |
| 4.5. Aspecto macroscópico das lesões .....   | 124        |
| 4.6. Localização das lesões .....  | 124        |
| 4.7. Focalidade das lesões .....   | 125        |
| 4.8. Alterações epiteliais adjacentes .....  | 125        |
| 4.9. Sinais histológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humanos .....    | 127        |
| 4.10. Detecção do antígeno viral através da imuno-histoquímica .....               | 128        |
| 4.11. Detecção do DNA viral através da hibridização molecular <i>in situ</i> ..... | 129        |
| 4.12. Presença do HPV, detectado através de uma ou outra técnica .....             | 131        |
| 4.13. Detecção da proteína p53 através da imuno-histoquímica .....                 | 132        |
| <b>V. DISCUSSÃO .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III .....</b>                           | <b>135</b> |
| 1.1. Incidência e distribuição etária .....  | 135        |
| 1.2. Etnia .....   | 137        |
| 1.3. História de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior ..... | 137        |
| 1.4. Aspecto macroscópico das lesões .....   | 139        |
| 1.5. Focalidade das lesões .....   | 139        |
| 1.6. Localização das lesões .....  | 140        |
| 1.7. Variantes histológicas .....  | 140        |
| 1.8. Sinais histológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humanos .....    | 142        |
| 1.9. Alterações epiteliais adjacentes às lesões de NIV III .....                   | 143        |
| 1.10. Extensão para os anexos cutâneos .....                                       | 145        |
| 1.11. Detecção do antígeno viral através da imuno-histoquímica .....               | 146        |
| 1.12. Detecção do DNA viral através da hibridização molecular <i>in situ</i> ..... | 148        |
| 1.13. Detecção da proteína p53 através da imuno-histoquímica .....                 | 157        |
| 1.14. Etiologia e fatores de risco .....   | 165        |
| 1.15. História natural .....   | 171        |
| <b>2. CARCINOMA ESCAMOSO SUPERFICIALMENTE INVASIVO .....</b>                       | <b>175</b> |
| <b>3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA .....</b>                               | <b>179</b> |
| 3.1. Distribuição etária .....   | 181        |
| 3.2. Aspecto macroscópico das lesões .....   | 182        |

|  |     |
|--|-----|
| 3.3. Localização das lesões .....  | 183 |
| 3.4. Focalidade das lesões .....   | 183 |
| 3.5. Metástases ganglionares.....  | 184 |
| 3.6. Recidiva da neoplasia .....   | 189 |
| 3.7. Etiologia, patogênese e fatores de risco .....                            | 192 |
| 3.8. Outras variantes histológicas raras do carcinoma invasivo da vulva .....  | 228 |
| 4. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TRÊS GRUPOS DE PACIENTES .....                 | 231 |
| 5. TABELAS-RESUMO DOS PRINCIPAIS ACHADOS NOS TRÊS GRUPOS DE<br>PACIENTES ..... | 233 |
| <b>VI. CONCLUSÕES</b> .....  | 235 |
| <b>SUMMARY</b> .....   | 239 |
| <b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                   | 241 |
| <b>ANEXOS</b>  |     |
| ANEXO I. Relação global dos dados encontrados .....                            | 263 |
| ANEXO II. Preparo das soluções para as reações .....                           | 273 |
| ANEXO III. Procedimento das reações .....                                      | 275 |

## LISTA DE TABELAS

---

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| TABELA 1 -  | Distribuição das lesões de NIV III somando-se todas as regiões envolvidas .  | 63  |
| TABELA 2 -  | Intensidade e localização das alterações histológicas sugestivas de infecção viral nas lesões de NIV III .....   | 67  |
| TABELA 3 -  | Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular <i>in situ</i> para a detecção dos papilomavírus humanos nas lesões de NIV III ....                   | 76  |
| TABELA 4 -  | Relação entre detecção do papilomavírus humanos e as variáveis analisadas .....  | 76  |
| TABELA 5 -  | Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos nas lesões de NIV III .....  | 78  |
| TABELA 6 -  | Distribuição das lesões de carcinoma superficialmente invasivo na região vulvar .....  | 83  |
| TABELA 7 -  | Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular <i>in situ</i> para a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma superficialmente invasivo ..... | 88  |
| TABELA 8 -  | Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma superficialmente invasivo .....   | 90  |
| TABELA 9 -  | Distribuição das lesões de carcinoma invasivo, somando-se todas as regiões da vulva envolvidas isoladamente .....  | 96  |
| TABELA 10 - | Principais achados relacionados aos subtipos histológicos do carcinoma invasivo vulvar .....   | 99  |
| TABELA 11 - | Intensidade e localização das alterações histológicas sugestivas de infecção viral no carcinoma invasivo.....  | 101 |
| TABELA 12 - | Comparação de proporções e das idades médias das pacientes contendo lesões distróficas e NIV III no epitélio adjacente ao carcinoma invasivo .....                             | 107 |
| TABELA 13 - | Comparação de proporções e das idades médias das pacientes em relação à presença ou ausência de metástases ganglionares .....  | 110 |
| TABELA 14 - | Achados mais importantes encontrados em três pacientes com carcinoma invasivo e pesquisa para o antígeno viral positiva .....  | 111 |
| TABELA 15 - | Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular <i>in situ</i> para a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma escamoso invasivo vulvar .....  | 113 |
| TABELA 16 - | Relação entre detecção do papilomavírus humanos e as variáveis analisadas .....  | 114 |
| TABELA 17 - | Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos, com as variantes histológicas do carcinoma escamoso invasivo vulvar.....                      | 116 |
| TABELA 18 - | Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma escamoso invasivo da vulva .....  | 116 |
| TABELA 19 - | Características mais importantes encontradas nos três grupos de pacientes.   | 120 |
| TABELA 20 - | Distribuição por grupo etário das pacientes contendo NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma invasivo da vulva.....   | 121 |
| TABELA 21 - | Distribuição étnica nos três grupos de pacientes .....   | 122 |

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| TABELA 22 - | Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos três grupos de pacientes .....   | 122 |
| TABELA 23-  | Distribuição das lesões multicêntricas e idades médias correspondentes nos três grupos de pacientes .....  | 123 |
| TABELA 24 - | Distribuição topográfica das lesões vulvares nos três grupos de pacientes ...  | 124 |
| TABELA 25 - | Intensidade e localização das alterações histológicas sugestivas de infecção viral nos três grupos de pacientes .....  | 127 |
| TABELA 26 - | Achados mais importantes relacionados ao resultado da imuno-histoquímica para a detecção dos papilomavírus humanos associando-se os três grupos de pacientes .....                                   | 129 |
| TABELA 27 - | Achados mais importantes relacionados à detecção do DNA dos papilomavírus humanos associando-se os três grupos de pacientes .....  | 130 |
| TABELA 28 - | Achados mais importantes relacionados à detecção dos papilomavírus humanos, através da imuno-histoquímica ou da hibridização molecular <i>in situ</i> , somando-se os três grupos de pacientes ..... | 131 |
| TABELA 29 - | Relação entre a presença da proteína p53 e as outras variáveis analisadas nos três grupos de pacientes .....   | 132 |
| TABELA 30 - | Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos associando-se os três grupos de pacientes .....  | 133 |
| TABELA 31 - | Relação do número de casos de NIV III e o período levantado em diferentes trabalhos da literatura .....  | 136 |
| TABELA 32 - | Relação do número de casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva e o período levantado em diferentes trabalhos da literatura .....   | 180 |
| TABELA 33 - | Incidência e tipos de alterações encontradas no epitélio adjacente ao carcinoma invasivo da vulva em diferentes trabalhos da literatura .....  | 213 |
| TABELA 34 - | Pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar grau III .....   | 233 |
| TABELA 35 - | Pacientes com carcinoma superficialmente invasivo .....  | 233 |
| TABELA 36 - | Pacientes com carcinoma escamoso invasivo .....  | 234 |

## LISTA DE FIGURAS

---

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 1 - Distribuição dos casos de NIV III, levantados entre 1983 e 1995 .....   | 59  |
| FIGURA 2 - Idade das pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar grau III .....  | 60  |
| FIGURA 3 - Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos casos de NIV III .....  | 61  |
| FIGURA 4 - Neoplasia intraepitelial vulvar grau III, variante bowenóide .....  | 65  |
| FIGURA 5 - Neoplasia intraepitelial vulvar grau III, variante basalóide .....  | 65  |
| FIGURA 6 - Alterações coilocitóticas na superfície do epitélio de NIV III bowenóide .....  | 66  |
| FIGURA 7 - Condiloma acuminado adjacente a NIV III bowenóide .....   | 69  |
| FIGURA 8 - Reação positiva para o antígeno viral na superfície do epitélio de NIV III .....  | 70  |
| FIGURA 9 - Reação positiva para o antígeno viral no terço superior do epitélio de condiloma acuminado adjacente à NIV III .....  | 70  |
| FIGURA 10 - Hibridização molecular <i>in situ</i> positiva para o HPV 16/18 no terço superior do epitélio com NIV III bowenóide, em células desprovidas de coilocitose ..... | 73  |
| FIGURA 11 - Hibridização molecular <i>in situ</i> positiva para o HPV 6/11 no terço superior do epitélio, em lesão de condiloma acuminado adjacente à NIV III .....          | 73  |
| FIGURA 12 - Reação positiva focal para a proteína p53 em NIV III bowenóide .....   | 77  |
| FIGURA 13 - Distribuição dos casos de carcinoma escamoso vulvar superficialmente invasivo, levantados entre 1983 e 1995 .....  | 80  |
| FIGURA 14 - Idade das pacientes com carcinoma superficialmente invasivo da vulva .....   | 81  |
| FIGURA 15 - Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos casos de carcinoma superficialmente invasivo da vulva .....                                  | 82  |
| FIGURA 16 - Carcinoma superficialmente invasivo da vulva .....   | 85  |
| FIGURA 17 - Reação positiva para a proteína p53 em escassos blocos tumorais do carcinoma superficialmente invasivo .....   | 89  |
| FIGURA 18 - Distribuição dos casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva, levantados entre 1983 e 1995 .....   | 91  |
| FIGURA 19 - Idade das pacientes com carcinoma escamoso invasivo vulvar .....   | 92  |
| FIGURA 20 - Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva .....  | 93  |
| FIGURA 21 - Variantes histológicas do carcinoma escamoso invasivo da vulva .....   | 97  |
| FIGURA 22 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão queratinizante .....   | 98  |
| FIGURA 23 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão basalóide .....  | 98  |
| FIGURA 24 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão condilomatoso .....  | 98  |
| FIGURA 25 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão verrucoso .....  | 99  |
| FIGURA 26 - Lesões distróficas associadas ao carcinoma invasivo .....  | 104 |
| FIGURA 27 - Carcinoma escamoso invasivo queratinizante associado a NIV III bowenóide ...   | 104 |
| FIGURA 28 - Reação positiva para o antígeno viral em células isoladas do carcinoma escamoso invasivo, variante basalóide .....   | 110 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 29 - Hibridização molecular <i>in situ</i> positiva para o HPV 16/18 no epitélio com NIV III adjacente ao carcinoma invasivo padrão basalóide .....                           | 112 |
| FIGURA 30 - Reação positiva para a proteína p53 em carcinoma invasivo queratinizante, com distribuição difusa, predominantemente nas camadas mais externas dos blocos tumorais ..... | 115 |
| FIGURA 31 - Reação positiva para a proteína p53 em carcinoma invasivo .....  | 115 |
| FIGURA 32 - Número total de casos de NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e invasivo da vulva, levantados entre 1983 e 1995 .....  | 119 |
| FIGURA 33 - Idade das pacientes com NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma invasivo da vulva .....   | 121 |

## RESUMO

---

O carcinoma da vulva é ainda hoje uma doença de etiologia indefinida. Estudos recentes apontam para uma origem multifatorial onde os papilomavírus humanos (HPV) seriam os agentes responsáveis pelo desenvolvimento da neoplasia vulvar em grupos etários mais jovens, enquanto que nas pacientes mais idosas estaria provavelmente relacionada à presença de lesões distróficas, de mutações genéticas, além de outros fatores ainda pouco conhecidos. Tivemos como objetivo avaliar a presença do HPV e da proteína p53 e correlacioná-las com outros parâmetros clínico-patológicos nos grupos de pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar (NIV III – 38 casos), carcinoma superficialmente invasivo (nove casos) e carcinoma escamoso invasivo da vulva (55 casos). A detecção do HPV foi realizada através de exame imuno-histoquímico com o anticorpo anti-HPV policlonal e da hibridização molecular *in situ* com sondas biotiniladas de amplo espectro e para os tipos 6/11, 16/18 e 31/35/51. A proteína p53 foi identificada através de exame imuno-histoquímico com o anticorpo monoclonal DO-7. No grupo com NIV III a idade média das pacientes foi de 47,5 anos; 45,7% tinham lesão de condiloma associado, o HPV estava presente em 57,9% dos casos e a proteína p53 em 21,1%. As pacientes com carcinoma superficialmente invasivo tinham idade média de 57,9 anos, lesão de condiloma em 22,2%, detecção do HPV em 33,3% e da proteína p53 em 66,7% dos casos. No carcinoma escamoso invasivo a idade média foi de 67,8 anos e apenas 7,3% das pacientes tinham lesão de condiloma associado; lesões distróficas estavam presentes em 60% dos casos e NIV III em 25,5%; o HPV foi identificado em 7,3% e a proteína p53 em 58,2%. A detecção do HPV foi mais freqüente no grupo com lesão de NIV III e estava relacionada à idade mais jovem das pacientes. No grupo com carcinoma invasivo, a variante histológica mais freqüente foi a queratinizante usual e estava associada à presença de lesões distróficas e da proteína p53. Entretanto, uma pequena subpopulação de pacientes mais jovens continham a variante basalóide do carcinoma invasivo, freqüentemente associada à lesão de NIV III e à infecção pelo HPV. Os nossos resultados são semelhantes aos da literatura, onde um grupo de lesões está relacionado com a infecção pelo HPV e outro não. O HPV 16/18 foi o tipo predominante em todos os grupos de lesões. Índices mais baixos de detecção da p53 nas lesões de NIV III e maiores e com proporções semelhantes no carcinoma superficialmente invasivo e invasivo, além da ausência de relação entre a presença da p53 e do HPV, indicam que a imunodeteção da p53 é secundária à invasão do estroma pela neoplasia e é independente da presença de infecção viral. A detecção da proteína p53 estava associada apenas com a profundidade de invasão tumoral e não mostrou relação com neoplasia recidivante ou metástases ganglionares e, portanto, não tem valor como marcador para lesões recidivantes ou metastáticas, pelo menos para o grupo de pacientes incluídas neste trabalho.

## I . INTRODUÇÃO

---

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento na incidência do diagnóstico de neoplasia intraepitelial vulvar grau III (NIV III), principalmente em pacientes mais jovens (HØRDING et al., 1994; COSTA et al., 1995; KAUFMAN, 1995).

Isto talvez se deva, pelo menos em parte, a um melhor conhecimento desta entidade levando ao exame mais cuidadoso da região vulvar e à realização de um maior número de biópsias (FU & REAGAN, 1989; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1994; GILES & KNEALE, 1995; KAUFMAN, 1995; HEROD et al., 1996; IVERSEN & TRETTLI, 1998). Além disso, concomitantemente, houve um aumento do número de pacientes apresentando doenças sexualmente transmissíveis, destacando-se entre elas a infecção por papilomavírus humanos (HPV), cuja incidência é maior em pacientes mais jovens e interpretado como secundária à mudança dos hábitos sexuais na população em geral (CRUM, 1987; HØRDING et al., 1991; STURGEON et al., 1992; COSTA et al., 1995; GILES & KNEALE, 1995; KAUFMAN, 1995; EDWARDS et al., 1996).

Contrariamente às lesões de NIV III, a incidência de pacientes apresentando carcinoma escamoso invasivo da vulva permaneceu estável (FU & REAGAN, 1989; HØRDING et al., 1993, 1994, 1995; SCHIFFMAN & BRINTON, 1994; KAUFMAN, 1995).

O carcinoma invasor vulvar é uma afecção incomum entre as neoplasias do trato genital feminino, correspondendo a 1/8 da freqüência do carcinoma invasivo cervical. Nos Estados Unidos da América acomete aproximadamente 1,6 para cada 100.000 mulheres. Ocorre em mulheres mais idosas, predominantemente ao redor da sétima e oitava década de vida (ZAINO, 1987; FU & REAGAN, 1989; BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; STURGEON et al., 1992; MITCHELL et al., 1993; SCHIFFMAN & BRINTON, 1994), embora seja também diagnosticado menos freqüentemente, em grupos etários mais jovens (HØRDING et al., 1993).

Embora existam poucos estudos epidemiológicos comparativos e com casos-controles, têm sido apontados vários fatores de risco para o carcinoma vulvar, entre eles: a presença de neoplasias urogenitais, história de verrugas genitais e outras doenças sexualmente transmissíveis (herpes vírus, papilomavírus humanos, sífilis, doenças vulvares crônicas granulomatosas, tricomoníase, clamídia), pobre higiene perineal, inflamações crônicas vulvo-vaginais, distrofias vulvares, neoplasias intraepiteliais vulvares, citologia cérvico-vaginal alterada, baixo nível sócio-econômico, fatores hormonais (paridade, uso de anticoncepcionais orais, menopausa precoce), diabetes mellitus, obesidade, hipertensão arterial, fumo, consumo de cafeína, exposição a carcinógenos físicos e químicos como arsênico e radiação ionizante pélvica, estado imunológico e alterações genéticas. Entretanto, os resultados são contraditórios entre os diferentes trabalhos e ainda não existem atualmente fatores epidemiológicos consistentes para se identificar mulheres de risco para o desenvolvimento do câncer vulvar (GROSS, 1987; ZAINO, 1987; FU & REAGAN, 1989; BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1993; MITCHELL et al., 1993; SCHIFFMAN & BRINTON, 1994; KAUFMAN, 1995).

Pela presença da alta associação de neoplasia vulvar com outras lesões malignas, principalmente no trato genital inferior e em especial na cérvix uterina (BUSCEMA et al., 1988; FU & REAGAN, 1989; CRUM, 1992; SCHIFFMAN & BRINTON, 1994), tem havido interesse em se determinar se os fatores de risco para o carcinoma do colo uterino são também preditivos do risco para o desenvolvimento do câncer vulvar. Alguns trabalhos mostram que o carcinoma da vulva compartilha de certas características epidemiológicas com o carcinoma cervical como: baixo nível sócio-econômico, fumo, número de parceiros sexuais e história de verrugas genitais, sugerindo um fator etiológico comum (GROSS, 1987; BRINTON et al., 1990; TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1993, 1994; TRIMBLE et al., 1996). Além disso, devido a sua proximidade anatômica, ambos parecem estar expostos às mesmas influências externas como, por exemplo, à infecção por HPV, herpes vírus tipo 2 (HSV2) e outros fatores ambientais, podendo em parte explicar a relação freqüente entre neoplasias genitais multifocais e multicêntricas (GROSS, 1987; BRINTON et al., 1990; WIKSTRÖM, 1995).

Devido ao carcinoma de células escamosas e lesões pré-neoplásicas do colo uterino estarem intimamente associados à infecção por HPV, tem sido questionado também o seu papel na gênese do carcinoma vulvar. Apesar de se tentar correlacionar com os

resultados obtidos nos estudos da cérvix uterina, existem numerosas diferenças epidemiológicas e de comportamento clínico entre as lesões vulvares e cervicais, sugerindo que o papel do HPV na etiologia destas duas lesões seja diferente, destacando-se:

- maior incidência de carcinoma cervical em relação ao carcinoma vulvar;
- a idade média das pacientes apresentando carcinoma cervical é menor do que as com carcinoma vulvar, estando ao redor de 50 e 66 anos, respectivamente. Também, há uma diferença de aproximadamente duas décadas entre as idades médias das pacientes apresentando NIV III e carcinoma invasor vulvar, enquanto que na cérvix uterina esta diferença é de cerca de dez a quinze anos;
- no colo, a presença de neoplasia intraepitelial cervical grau III adjacente ao carcinoma invasivo ocorre em 80 a 100 % dos casos, enquanto na vulva esta associação é menor, variando de 12 a 32 %. Além disso, diferente do colo uterino, onde é possível acompanhar histologicamente a progressão da neoplasia intraepitelial de baixo grau para a de alto grau e carcinoma invasor, isto não é observado na vulva;
- menor progressão para invasão das lesões intraepiteliais vulvares em comparação com as lesões cervicais e evolução mais longa, respectivamente, 25 e 15 anos;
- altos índices de detecção de DNA do HPV nas lesões intraepiteliais e invasivas cervicais, ocorrendo em 80 a 99,7 % dos casos e menor nas lesões vulvares, respectivamente, 40-90 % e 10-60 % (BUCKLEY, BUTLER, FOX, 1984; CRUM et al., 1984; ZAINO, 1987; BARBERO et al., 1990; NUOVO et al., 1991b; PARK et al., 1991a; TOKI et al., 1991; WOODRUFF, 1991; CRUM, 1992; STURGEON et al., 1992; HØRDING et al., 1993, 1994, 1995; MITCHELL et al., 1993; KAUFMAN, 1995; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; WALBOOMERS et al., 1999).

Com o desenvolvimento de diferentes técnicas para a detecção do HPV nas lesões genitais, tornou-se possível explorar mais diretamente a relação do vírus com as neoplasias vulvares (BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1993; CHO & HEDRICK, 1994; SCHIFFMAN & BRINTON, 1994). Além da observação clínica, do

estudo citológico, histológico e de microscopia eletrônica das lesões, podemos também utilizar a análise imuno-histoquímica e técnicas de biologia molecular, como a hibridização (ROMAN & FIFE, 1989).

Entre os dados que apontam para o HPV como possível agente etiológico nas neoplasias vulvares estão: história prévia de verrugas genitais em 20 a 30 % dos casos, alta associação com condiloma pré- ou coexistente, a observação da transformação maligna do condiloma e detecção de genótipos específicos do HPV nestas lesões (BUSCEMA et al., 1988; FU & REAGAN, 1989; CRUM, 1992; STURGEON et al., 1992). Entretanto, a maioria dos trabalhos relacionando a infecção pelo HPV com lesões genitais específicas é retrospectiva e sem controles apropriados (ROMAN & FIFE, 1989).

Tem sido observado que as pacientes apresentando NIV III e carcinoma invasivo da vulva, possuem características epidemiológicas, morfológicas e de biologia molecular distintas. Entre elas destacamos:

- diferença de cerca de 20 a 30 anos entre as idades médias das pacientes apresentando NIV III e carcinoma invasivo;
- baixa associação de lesões intraepiteliais neoplásicas adjacentes ao carcinoma invasor, ocorrendo em cerca de 1/3 dos casos;
- rara progressão de NIV III para invasão, ocorrendo principalmente em pacientes mais idosas ou imunodeprimidas;
- alto índice de detecção do DNA viral nas lesões intraepiteliais e baixo nos carcinomas invasores (BUCKLEY et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986; CRUM, 1987, 1992; ZAINO, 1987; CRUM & BURKETT, 1989; PARK et al., 1991a; TOKI et al., 1991; WOODRUFF, 1991; STURGEON et al., 1992; JONES & ROWAN, 1994; HØRDING et al., 1995).

Dentre o grupo de pacientes com diagnóstico de neoplasia intraepitelial vulvar, são também observadas algumas particularidades, podendo-se assim dividi-las em duas populações distintas (CRUM, 1984, 1987; HUSSEINZADEH et al., 1989; HØRDING et al., 1991; PARK et al., 1991a; HAEFNER et al., 1995; EDWARDS et al., 1996):

1. mulheres mais jovens, apresentando freqüentemente lesões multifocais e multicêntricas, com alto índice de detecção do HPV, eventual regressão espontânea das lesões e baixo risco de progressão para invasão;
2. mulheres mais idosas, com lesões unifocais, baixo índice de detecção do HPV e maior risco de progressão para invasão. Freqüentemente associada a alterações distróficas ou inflamatórias e são geralmente de padrão histológico diferenciado.

Questiona-se se estas duas populações de pacientes possuem lesões biologicamente distintas, ou se a idade por si só é um fator de risco para o desenvolvimento de lesão invasiva (CRUM, 1987; CRUM & BURKETT, 1989; BARBERO et al., 1990).

Também são notadas disparidades entre as pacientes apresentando carcinoma invasivo vulva quanto à idade da população em estudo, à associação com lesões precancerosas, ao aspecto morfológico da neoplasia invasora e à detecção do HPV. Estudos atuais indicam que o carcinoma vulvar deve ser separado em dois grandes grupos (NUOVO et al., 1991b; TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1993, 1994; COSTA et al., 1995; TRIMBLE et al., 1996):

1. mulheres com idade média mais jovem, ao redor de 55 anos, freqüentemente com lesão de NIV III adjacente, associação com lesões multicêntricas e multifocais, alto índice de detecção do DNA do HPV, fumantes e neoplasia invasora de padrão histológico do tipo condilomatoso ou basalóide;
2. pacientes mais idosas, com idade média ao redor de 77 anos, não associadas à neoplasia intraepitelial adjacente, não fumantes, geralmente contendo lesões unifocais e unicêntricas e baixo índice de detecção do DNA viral. Tipicamente o padrão histológico da neoplasia invasora é o carcinoma escamoso queratinizante e freqüentemente apresentam no epitélio adjacente lesão de líquen escleroso ou hiperplasia escamosa.

A discrepância dos achados em relação aos dados epidemiológicos, morfológicos e de biologia molecular entre as lesões intraepiteliais e invasivas da vulva, leva ao questionamento da magnitude do papel dos papilomavírus humanos nestas lesões,

sugerindo a existência de mais de uma etiologia e patogênese, além do envolvimento de diferentes fatores de risco.

Assim, parece que há uma heterogeneidade epidemiológica envolvida no carcinoma vulvar, onde em um grupo de pacientes está relacionado a fatores sexuais (como por exemplo, à infecção por HPV), enquanto o outro grupo possui patogênese menos definida, não relacionada ao HPV e influenciada por outros fatores que não sexualmente transmissíveis como: inflamações e lesões distróficas vulvares, fumo, anticoncepcionais orais, hormônios exógenos e alterações genéticas, entre outros, os quais devem ser mais bem investigados (BRINTON et al., 1990; NUOVO et al., 1991b; TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; STURGEON et al., 1992; MITCHELL et al., 1993; CHO & HEDRICK, 1994; HØRDING et al., 1994; COSTA et al., 1995; HIETANEN et al., 1995b).

Embora pareça provável que o HPV desempenhe um papel direto ou indireto, pelo menos em um determinado grupo de neoplasias vulvares, devido aos poucos trabalhos existentes na literatura em relação à patogênese destas lesões, com resultados variáveis e controvertidos, é imprescindível que mais estudos epidemiológicos, histopatológicos e de biologia molecular sejam realizados para um melhor entendimento da carcinogênese vulvar. A identificação do mecanismo patogênico e de seus fatores de risco é de vital importância para a prevenção e tratamento destas lesões (CRUM, 1987, 1992; ZAINO, 1987).

## 1. GENE SUPRESSOR TUMORAL P53

Estudos citogenéticos do carcinoma vulvar demonstram a presença de certas anormalidades cromossômicas (CHO & HEDRICK, 1994; HIETANEN et al., 1995b; MILDE-LANGOSCH et al., 1995). Como a incidência do carcinoma da vulva aumenta em função da idade, é possível que uma parcela destes tumores se origine como resultado de mutações espontâneas secundárias ao envelhecimento celular (HIETANEN et al., 1995b).

Por ser o mais freqüentemente alterado nos cânceres humanos, o gene supressor tumoral P53 tem sido exaustivamente estudado no carcinoma cervical, principalmente após ter sido demonstrada a capacidade de ligação da oncoproteína E6 de HPV oncogênico com este gene (TERVAHAUTA et al., 1993; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

O gene P53 está localizado no cromossomo 17 e é considerado como o “guardião” do genoma humano, monitorizando a sua integridade. Funciona como regulador negativo da proliferação celular promovendo respostas frente aos efeitos danosos que possam ocorrer no DNA, através da indução da parada do crescimento na fase G1 do ciclo vital ou da apoptose, preservando assim a estabilidade genética. O genoma humano contém vários sítios de ligação para o P53, o qual realiza a sua função através de etapas bioquímicas, levando a ativação da transcrição de genes inibitórios, a supressão da transcrição de genes regulatórios e a inibição da replicação do DNA. Numerosos genes são controlados pelo P53, como o GADD45, MDM2, P21<sup>WAF1/CIP1</sup>, entre outros (TERVAHAUTA et al., 1993; BERCHUCK et al., 1994; CORDON-CARDO, 1995; ter HARMSEL et al., 1995; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

A perda da função normal do P53 no câncer humano pode ser alcançada através de vários mecanismos (TERVAHAUTA et al., 1993; BOSARI & VIALE, 1995):

- alterações genéticas do P53 (mutações, deleções, inserções, rearranjos estruturais,);
- formação de complexos proteicos com as oncoproteínas virais, como por exemplo, com a proteína E6 do HPV;
- ligação com produtos dos genes celulares, entre outros, com o MDM2.

A heterogeneidade observada entre os diversos estágios da tumorigênese nos variados tipos de tumor e tecidos, talvez seja secundária aos diferentes mecanismos existentes capazes de levar à inativação da proteína p53 (TERVAHAUTA et al., 1993).

A mutação do P53 tem sido identificada em vários tumores humanos, localizados no pulmão, pele, trato gastrointestinal, pâncreas, ovário, endométrio, mama e bexiga urinária. Pode ocorrer como um evento inicial ou tardio na progressão das lesões dependendo do tipo do tecido neoplásico. O espectro das alterações do gene P53 no DNA da célula varia entre os diferentes tipos de câncer, porém é detectado em cerca de 85% dos casos nos exons 5-8 (TERVAHAUTA et al., 1993; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

A mutação do gene P53 pode ser identificada utilizando-se o método da reação em cadeia da polimerase seguida do seqüenciamento direto do DNA ou da técnica do “polimorfismo da conformação da cadeia única” (“single-strand conformation polymorphism”) e também indiretamente, com a detecção da sua proteína através do exame imuno-histoquímico, sendo, entretanto, o primeiro método o mais preciso (BOSARI & VIALE, 1995; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

O exame imuno-histoquímico é baseado no fato de que a proteína não mutada possui vida média muito curta, entre seis a 20 minutos, impossibilitando a sua detecção, enquanto que a vida média da proteína mutante é de várias horas (até seis horas), permitindo assim que seja detectada através deste método. Quando comparada com o seqüenciamento direto, esta técnica apresenta uma sensibilidade de 75% e valor preditivo de 63% (TERVAHAUTA et al., 1993; BOSARI & VIALE, 1995; HIETANEN et al., 1995b; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; ter HARMSEL et al., 1995; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

Trabalhos mostram um alto índice de reação positiva para a proteína p53 em cerca de 50% dos tumores malignos do trato aerodigestivo, da mama, ovários e endométrio (PORTER et al., 1992; BERCHUCK et al., 1994; INOUE et al., 1994).

Níveis altos de p53 estão associados com a transformação celular *in vitro* e pode ser um indicador da transformação celular *in vivo* (PORTER et al., 1992).

A ausência de imunodeteção da proteína p53 no tecido fetal sugere que não é a atividade proliferativa, mas sim a transformação maligna que está associada com a sua positividade. Assim, a sua demonstração em tumores benignos poderia indicar a presença de uma sub-população de células potencialmente malignas (PORTER et al., 1992).

## 1.1. P53 E NEOPLASIA CERVICAL

Os trabalhos relacionando a presença de mutação do gene P53 na patogênese do desenvolvimento neoplásico na cérvix uterina são controvertidos e as diferentes incidências observadas podem ser, pelo menos em parte, secundárias à heterogeneidade dos métodos de detecção utilizados. As mutações são raras, detectadas em cerca de 5 a 10% dos casos. Assim, parece que a mutação do P53 pode ter um papel na carcinogênese cervical, embora em uma minoria dos casos (BERCHUCK et al., 1994; BUSBY-EARLE et al., 1994; LEE et al., 1994; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; MIWA et al., 1995; KIM et al., 1996; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996; SLIUTZ et al., 1997).

Alguns estudos mostram correlação inversa entre a presença de mutação e a detecção do HPV e levantam a hipótese de que a perda da função do P53 é importante, seja através da sua ligação com a oncoproteína viral E6 ou da mutação do gene P53. Além disso, a presença de ambos poderia indicar tumores com vantagem de crescimento e pior prognóstico (SCHEFFNER et al., 1991; LEE et al., 1994; MIWA et al., 1995; ter HARMSEL et al., 1995; EDWARDS et al., 1996; KIM et al., 1996, 1997). Entretanto, são relatados casos onde ambos estão presentes ou ausentes, e também não relacionados com o número de cópias virais e com o estado do vírus, isto é, se integrado ou na forma episomal, demonstrando uma relativa independência na distribuição das mutações em tumores cervicais contendo ou não o HPV, sendo considerados, portanto, como fenômenos mutuamente não excludentes (COOPER et al., 1993; HELLAND et al., 1993; WALTERS et al., 1993; BUSBY-EARLE, et al., 1994; TATE et al., 1994; MIWA et al., 1995; ter HARMSEL et al., 1995; KIM et al., 1997).

A presença do HPV associada à alteração do P53 varia entre os diferentes trabalhos. MILDE-LANGOSCH et al. (1995) e MIWA et al. (1995) encontraram uma incidência de 4,9% e 2,2 respectivamente, e LEE et al. (1994) em 47% dos casos. SCHEFFNER et al. (1991) detectaram a presença de mutação nas duas linhagens de células provenientes de carcinoma cervical HPV-negativo, MILDE-LANGOSCH et al. (1995) em 20% e MIWA et al. (1995), em 33,3% dos casos. KIM et al. (1997) não identificaram mutações nos tumores onde o HPV estava ausente, e MIWA et al. (1995) observaram que dentre os seis tumores HPV-negativos, quatro não apresentavam mutação (66,7%).

Assim, a ausência de ambos poderia indicar que outros eventos moleculares ainda não identificados e associados com os mecanismos da função reguladora do P53 ou a presença de mutação em outros genes, também sejam relevantes para a carcinogênese (MIWA et al., 1995; KIM et al., 1997).

Uma das hipóteses aventadas para os tumores onde não se observa mutação do gene P53 e não se detecta o HPV, é de que haveria alterações em outras proteínas que pudessem inibir a atividade do P53 (MIWA et al., 1995; PILOTTI et al., 1995), entre elas o gene MDM2 ("murine double minute 2"). Este gene atua como regulador da função da proteína p53, sendo capaz de inibir a sua trans-ativação. Assim, seria de se esperar que ocorresse nestes tumores uma amplificação do MDM2, o que não foi identificado nas neoplasias cervicais, bem como nos carcinomas vulvares intraepiteliais e invasivos nos estudos de MIWA et al. (1995) e PILOTTI et al. (1995), respectivamente.

A imunodeteccção da proteína p53 nas neoplasias intraepiteliais cervicais varia entre os diferentes trabalhos, embora seja em geral baixa, variando entre zero e 25,7% dos casos (AKASOFU & ODA, 1995; SLAGLE et al., 1998).

ter HARMSEL et al. (1995) observaram que o epitélio normal e com neoplasia intraepitelial de diferentes graus apresentavam positividade semelhante, em cerca de 30% dos casos, de caráter focal, localizado na camada basal do epitélio e de fraca intensidade; além disso, notaram um maior número de células coradas e com maior intensidade em 94% dos casos de carcinoma cervical invasivo.

Ao contrário de ter HARMSEL et al. (1995), que observaram que nem o número de casos positivos e nem a intensidade da coloração aumentaram com o grau de displasia, WALTERS et al. (1993) encontraram uma alta incidência de lesões com proteína p53 aumentada no epitélio normal e de NIC de baixo grau e alto grau, respectivamente em 83% e 73%, sendo que o número de células coradas e a intensidade da coloração eram maiores neste último grupo e ocupavam toda a espessura do epitélio.

AKASOFU & ODA (1995) detectaram um aumento gradual da p53 entre o epitélio normal (16,7%), NIC I (29,4%), NIC II (45%), NIC III (86,5%) e carcinoma invasor (87%), indicando que a sua inativação precede o desenvolvimento do tumor com fenótipo totalmente maligno e a invasão, isto é, que é um evento tardio na carcinogênese e

possui um papel importante na tumorigênese cervical (AKASOFU & ODA, 1995; ter HARMSEL et al., 1995). Embora AKASOFU & ODA (1995) tenham encontrado níveis semelhantes de p53 em NIC III e no carcinoma invasor, KOHLBERGER et al. (1998), em revisão da literatura, referem que na neoplasia intraepitelial cervical ela é menor.

Enquanto alguns autores identificaram a proteína p53 em 14 a 32% dos carcinomas cervicais invasivos (BUSBY-EARLE, et al., 1994; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; MIWA et al., 1995), outros encontraram uma incidência maior, entre 74 e 100%, com intensidade variável (COOPER et al., 1993; TERVAHAUTA et al., 1993; WALTS et al., 1993; AKASOFU & ODA, 1995; ter HARMSEL et al., 1995).

Alguns trabalhos associaram a imunodeteção da p53 à ausência do HPV e outros, identificaram ambos ou nenhum deles nas lesões (WALTS, KOEFFLER, SAID, 1993; AKASOFU & ODA, 1995; ter HARMSEL et al., 1995; VASSALLO et al., 2000).

TERVAHAUTA et al. (1993) observaram que todas as lesões intraepiteliais cervicais de alto grau apresentavam o papilomavírus humano e 42,8%, imunodeteção da proteína p53.

WALTS et al. (1993) estudando dez casos de neoplasia intraepitelial cervical grau II e III, identificaram sete positivos para a proteína p53 e destes, seis apresentavam o DNA viral. Dos três casos negativos, um tinha o HPV.

VECCHIONE et al. (1994) notaram proteína p53 aumentada em 4% das neoplasias intraepiteliais cervicais de baixo grau e em 31,2% das lesões de alto grau, sendo que destas últimas, 57% eram positivas para o HPV, parecendo indicar que a imunodeteção da p53 precede à invasão.

AKASOFU & ODA (1995) detectaram a proteína p53 em 62,1% das neoplasias intraepiteliais cervicais grau III. Destas, 16% eram HPV negativas e 46% positivas.

ter HARMSEL et al. (1995), avaliando lesões intraepiteliais cervicais de alto e baixo grau detectaram p53, de fraca intensidade, em 30% dos casos, sendo que 60% deles continham o DNA viral. Além disso, o número de casos positivos e a intensidade da reação apresentavam distribuição semelhante entre os diferentes graus de displasia.

O ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE (1996) encontrou p53 aumentada em 62,1% dos casos de neoplasia intraepitelial cervical grau III, sendo que 46% tinham o DNA do HPV.

VASSALLO et al. (2000) identificaram a proteína p53 em 47,4% das lesões de NIC I e em 20% de NIC II/III. O HPV estava presente em 55,3% e 52,5%, respectivamente. A proteína p53 estava associada ao HPV em 33,3% dos casos, com resultado semelhante naqueles onde o vírus não foi detectado.

Outra questão que deve ser levantada é se a expressão da proteína do gene P53 está diretamente relacionada com a presença de mutação. Embora esta relação seja observada na maioria dos carcinomas uroteliais, mamários e endometriais, ela não é observada no colo uterino (KOHLBERGER et al., 1995).

A presença de mutação nos casos com imunodeteção da p53 é baixa, variando entre zero e 25% (HELLAND et al., 1993; BUSBY-EARLE et al., 1994; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; MIWA et al., 1995). HELLAND et al. (1993), BUSBY-EARLE et al. (1994) e MIWA et al. (1995) observaram cada um, um caso contendo mutação e exame imuno-histoquímico negativos.

MIWA et al. (1995) observaram reação imuno-histoquímica positiva em 2/3 dos casos de carcinoma do colo uterino contendo mutação do gene P53. Estes autores e outros enfatizam a sensibilidade desta técnica em prever a presença de mutações (AKASOFU & ODA, 1995; BOSARI & VIALE, 1995).

A infreqüente associação de mutação e de imunodeteção da proteína p53 sugere que esta última esteja relacionada a uma maior expressão pelas células em reparo e não como consequência da mutação (HELLAND et al., 1993; BUSBY-EARLE, et al., 1994; AKASOFU & ODA, 1995). Entre outras possibilidades, seria também a de que a mutação poderia estar presente fora dos locais usualmente pesquisados ou em pequeno número de células, e, portanto, com níveis não detectáveis. Estas conclusões também poderiam ser aplicadas em casos com resultado negativo do exame imuno-histoquímico e conseqüentemente, não descartaria a presença de mutações.

INOUE et al. (1994) sugerem que a mutação está relacionada com a intensidade da reação imuno-histoquímica e que a imunodeteção de padrão zonal é secundária à

expressão da proteína não mutada em células rapidamente proliferantes. Entretanto, PILOTTI et al. (1995) consideram que este padrão está relacionado ao grau de diferenciação da neoplasia e não com a quantidade da proteína presente.

Os casos com ambos exames negativos podem indicar que embora mutante, a proteína p53 é capaz de ser degradada pela oncoproteína viral E6 (MIWA et al., 1995).

O ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE (1996) encontrou a proteína p53 em 62,1% dos casos de neoplasia intraepitelial cervical grau III e o DNA do HPV em 46%, embora nenhum deles apresentasse mutação no gene P53.

Deve ser também ressaltado que os métodos utilizados na detecção do vírus e da proteína ou mutação do gene P53 não permitem a comprovação de que ambos estejam localizados nas mesmas células (WALTS et al., 1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; KAGIE et al., 1997b).

O papel da inativação ou mutação do P53 em neoplasias de outras regiões do trato genital feminino inferior é ainda mais obscuro e só recentemente tem sido objeto de investigação, com poucos trabalhos publicados na literatura.

## 1.2. P53 E PROGNÓSTICO

Alguns autores consideram que a presença de mutação está associada a um pior prognóstico em certos tumores, secundária à perda da função supressora tumoral, à rádio- e quimio-resistência e à aquisição de propriedades oncogênicas. Entretanto, outros sugerem que o estado do P53 não necessariamente prediz a evolução da doença sendo assim indispensável à realização de mais estudos (TERVAHAUTA et al., 1993; BOSARI & VIALE, 1995; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

A expressão da proteína p53 tem sido relacionada à progressão tumoral em neoplasias específicas, embora ainda seja objeto de discussão o seu papel como preditor importante da evolução das pacientes (KAGIE et al., 1997a).

Estas informações em tumores malignos ginecológicos são ainda mais limitadas e também com resultados contraditórios (BERCHUCK et al., 1994; INOUE et al., 1994; SLIUTZ et al., 1997). Em carcinomas do ovário e endométrio, a imunodeteção da proteína p53 em 1 a 15% dos estágios iniciais da doença e em 40 a 50% das lesões mais avançadas, são consistentes com a hipótese de que a p53 serviria como marcador prognóstico (SLIUTZ et al., 1997). Entretanto, os estudos dos carcinomas escamosos do trato genital feminino inferior apresentam correlação inconsistente com a sobrevida (ter HARMSEL et al., 1995; McCONNELL et al., 1997).

No colo uterino, até o momento, não existe relação clara entre a imunodeteção da proteína p53, a agressividade do tumor e conseqüentemente, com a sobrevida das pacientes. Na maioria dos trabalhos, parece que a presença de mutação e/ou da proteína do gene P53 não tem valor prognóstico (KAGIE et al., 1997a; SLIUTZ et al., 1997). MILDE-LANGOSCH et al. (1995) não conseguiram associar mutação com a presença de recorrências e metástases e HELLAND et al. (1993) com o estadiamento da FIGO, embora estes últimos autores tenham notado relação com o tempo de sobrevida livre de doença. ter HARMSEL et al. (1995) consideram que embora a mutação seja um evento raro nas neoplasias da cérvix uterina, quando ela está presente, os tumores são mais agressivos e possuem maior potencial metastático.

Na vulva os trabalhos são escassos e com resultados contraditórios.

Enquanto KAGIE et al. (1997a, 1997b) e McCONNELL et al. (1997) referem que a imunodeteção da proteína p53 ou mutação do P53 não estava relacionada a um pior prognóstico e tempo livre de doença, WALKER et al. (1989), MILDE-LANGOSCH et al. (1995), PILOTTI et al. (1995), WEIKEL et al. (1996), SLIUTZ et al. (1997) e KOHLBERGER et al. (1998), observaram que a perda da função do P53 estava associada a um maior risco de progressão, recorrências e sobrevida baixa, sugerindo ser um marcador prognóstico adicional útil.

SLIUTZ et al. (1997) notaram que a presença de mutação era mais freqüente nos estádios mais avançados da doença, embora não fosse significativa através da análise estatística, sugerindo ser este um evento que ocorre tardiamente no desenvolvimento do carcinoma vulvar.

MILDE-LANGOSCH et al. (1995) identificaram mutação do P53 em 78,6% dos casos de carcinomas vulvares metastáticos e recorrentes e sugerem que a perda da função gênica está associada à progressão da neoplasia e a uma evolução desfavorável.

WALKER et al. (1989) e KAGIE et al. (1997a), através de estudo imuno-histoquímico, não encontraram correlação com o estadiamento clínico da FIGO e do TMN, embora mostrasse tendência para o estadiamento cirúrgico no trabalho deste último autor.

Deve ser ressaltado que a maioria dos trabalhos utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para a detecção da proteína p53, sem correlacioná-la com o estado do gene. É possível haver um aumento da expressão protéica na ausência de mutação, embora o seu significado prognóstico seja desconhecido e não é necessariamente paralelo ao da mutação (BOSARI & VIALE, 1995).

Até o momento não está claro se a alteração do P53 está relacionada ao prognóstico, sendo necessário que mais estudos sejam realizados, com grande amostragem populacional e com maior tempo de seguimento, focando ambos, a expressão e o estado do gene, na tentativa de se dar uma força estatística suficiente para o esclarecimento destas alterações em relação ao prognóstico. Também devem ser aprofundados os estudos relativos às mutações em todos os sítios do P53 e não somente nos exons 5-8, com o intuito de se avaliar o significado clínico de alterações genéticas distintas; nem todos os P53 mutantes são equivalentes, pois as regiões possuem funções distintas, podendo induzir efeitos clínicos e biológicos heterogêneos. Além disso, pode ser que a inativação protéica seja mais crítica do que a presença de certos tipos de mutação na determinação do comportamento biológico da neoplasia (BOSARI & VIALE, 1995; McCONNELL et al., 1997).

## 2. PATOGÊNESE VIRAL ASSOCIADA À NEOPLASIA CERVICAL

Estudos epidemiológicos mostram que os fatores de risco para o carcinoma cervical são semelhantes aos das doenças sexualmente transmissíveis, como: baixo nível sócio-econômico, comportamento sexual (idade da primeira relação sexual e número de parceiros), história de verrugas genitais e de outras doenças sexualmente transmissíveis (sífilis, vírus da imunodeficiência adquirida, clamídia e herpes vírus-HSV2), paridade, uso de anticoncepcionais orais, fumo, além de alterações genéticas e imunológicas (GROSS, 1987; BUSCEMA et al., 1988; BRINTON et al., 1990; BECKMANN et al., 1991; BOSCH et al., 1992; HØRDING et al., 1993; CHO & HEDRICK, 1994; WIKSTRÖM, 1995).

Com as evidências epidemiológicas sugerindo que as lesões escamosas intraepiteliais e invasivas do colo uterino estavam associadas a um fator infeccioso, foi dada uma maior atenção na tentativa de se isolar um agente etiológico destas lesões. Embora com resultados contraditórios, através de estudos imuno-histoquímicos e sorológicos, foram identificados inicialmente diferentes organismos infecciosos (NUOVO, 1994; FRANCO, 1996). Entretanto, com a promessa de ser o HPV o principal fator causal da neoplasia cervical, a investigação deste agente foi colocada em um lugar de destaque nas pesquisas. Dados provenientes de estudos epidemiológicos, clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e de biologia molecular desenvolvidos nos últimos quinze anos comprovam que a infecção por HPV é o fator de risco mais importante envolvido na carcinogênese cervical (BECKMANN et al., 1991; TOKI et al., 1991; BOSCH et al., 1992; CHO & HEDRICK, 1994; NUOVO, 1994; BORNSTEIN, RAHAT, ABRAMOVICI, 1995; FRANCO, 1996). Os principais argumentos relacionando HPV e carcinoma cervical são:

- a demonstração do envolvimento do HPV em lesões cervicais benignas e malignas através de métodos morfológicos, imuno-histoquímicos e de hibridização molecular;
- estudos de casos-controles mostrando alta prevalência do DNA do HPV, em cerca de 85 a 100% das lesões intraepiteliais e invasivas do colo uterino, através das técnicas de hibridização molecular;
- associação com genótipos específicos do HPV, identificando-se tipos virais oncogênicos em tecidos adjacentes às lesões cervicais premalignas e malignas;

- a infecção por HPV possuindo os mesmos fatores de risco e história natural semelhante à da neoplasia intraepitelial cervical.

Como o papel do papilomavírus foi mais bem estudado e relacionado com as lesões neoplásicas cervicais, pretendemos discutir de forma resumida, o papel do HPV na etiopatogenia do carcinoma escamoso do colo uterino.

O potencial oncogênico do HPV tem sido evidenciado através de estudos biológicos e moleculares, onde foi demonstrado que determinados tipos de HPV causam transformação e anormalidades de crescimento em culturas de linhagens celulares humanas. Pesquisas experimentais e em animais comprovaram a sua habilidade na indução do câncer de pele em coelhos e do trato digestivo no gado. Em humanos, notou-se que pacientes com epidermodisplasia verruciforme desenvolviam carcinoma escamoso invasivo nas áreas de verrugas expostas ao sol. Além disso, as observações da conversão maligna de verrugas genitais aceleraram os primeiros estudos na investigação da associação entre a infecção por HPV e o carcinoma do colo uterino (BORNSTEIN et al., 1995; SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

A maioria dos casos de câncer cervical pode ser atribuída ao papilomavírus humano, o qual é detectado em cerca de 85% das lesões intraepiteliais e invasivas. Os tipos identificados nas neoplasias genitais são: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54-56, 58, 59 e 64, sendo os mais freqüentes os tipos 16, 18, 31 e 45 (SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

ELUF-NETO et al. (1994) estudaram 199 casos de carcinoma invasivo do colo uterino, obtidos em sete hospitais da cidade de São Paulo e compararam com casos-controles. A pesquisa para o HPV foi realizada em esfregaços citológicos cérvico-vaginais através da técnica da reação em cadeia da polimerase, detectado em 84% dos casos, sendo que 66% eram de alto risco oncogênico. Os fatores de risco para neoplasia foram: a presença do vírus, o número de parceiros, a idade da primeira relação sexual, paridade e o uso prolongado de anticoncepcionais orais. História prévia de citologia cérvico-vaginal estava associada a um menor risco. Entretanto, após o ajuste das variáveis, apenas a presença do HPV, a paridade e a história de citologias anteriores permaneceram como fatores de risco independentes.

Atualmente considera-se que a maioria dos carcinomas do colo uterino HPV-negativos em publicações prévias é provavelmente consequência da insensibilidade dos testes utilizados para a detecção do vírus (SCHEFFNER et al., 1991).

WALBOOMERS et al. (1999) utilizaram o PCR para a amplificação das regiões E7, E1 e L1 do HPV e a análise sorológica para as proteínas E6, E7 e do capsídeo do HPV 16, em casos HPV-negativos previamente analisados pelo Estudo Biológico Internacional do Câncer Cervical (International Biological Study on Cervical Câncer – IBSCC). O IBSCC identificou o vírus em 93% dos carcinomas cervicais coletados em 22 países. Com a nova análise, WALBOOMERS et al. conseguiram uma positividade de 99,7% e referem que entre as causas para os resultados falso-negativos prévios estão a ruptura das seqüências-alvo do PCR secundária à integração viral e a presença de espécimes inadequados para a análise. Os casos negativos poderiam ser realmente HPV-negativos ou conter tipos não detectáveis, rupturas de seqüências virais, ou pequeno número de cópias virais. Os autores enfatizam que este estudo indica que praticamente todos os cânceres cervicais contêm o DNA do HPV e que uma vacinação profilática provavelmente eliminaria o câncer cervical, e isto seria especialmente relevante para os países menos desenvolvidos, onde as campanhas de prevenção são economicamente inviáveis. Por outro lado, para os países desenvolvidos, os seus resultados reforçariam a necessidade dos testes de detecção do HPV em conjunto, ou mesmo, em substituição à citologia cérvico-vaginal nos programas de prevenção.

A relação entre a infecção por HPV e o câncer cervical preenche todos os critérios estabelecidos para causalidade, isto é, consistência da associação epidemiológica, seqüência cronológica, especificidade da associação e coerência entre as evidências biológicas e epidemiológicas. A infecção tende a preceder e predizer a incidência da neoplasia cervical. Tipos de alto risco estão associados a um maior risco de se desenvolver lesões evidentes citologicamente e de progredir de lesões de baixo grau para de alto grau (SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

A alta incidência de infecção por papilomavírus na população geral, o alto índice de regressão espontânea destas lesões mesmo naquelas contendo tipos de alto risco, a baixa freqüência de neoplasia cervical em relação ao número de pacientes infectadas e a presença de tumores onde o vírus não é detectado, nos permite concluir que apenas a infecção por

HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical. Assim, passos adicionais e outros fatores de risco, devem estar implicados na sua patogênese (BORNSTEIN et al., 1995; HERRINGTON, 1995; PARK, FUJIWARA, WRIGHT, 1995; SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

Os mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical e na evolução das lesões intraepiteliais neoplásicas de baixo para alto grau e invasão, estão relacionados a:

## 2.1. FATORES VIRAIS

A maioria das infecções por HPV é transitória e apenas uma pequena parcela persiste e os fatores determinantes são pouco conhecidos. Entretanto, parece que, infecção persistente ocorre mais freqüentemente em mulheres com mais de 30 anos, contendo os tipos de alto risco e com número de partículas virais acima de 100 cópias/célula. Apenas a infecção persistente no epitélio cervical com tipos oncogênicos irá eventualmente desenvolver carcinoma (WIKSTRÖM, 1995; FRANCO, 1996; VOOG, 1996; SONNEX, 1998).

Acredita-se que a invasão esteja relacionada a eventos moleculares, como por exemplo, a integração do genoma do HPV ao DNA da célula hospedeira, embora este fenômeno seja pouco freqüente e ocorra ao acaso durante a persistência da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

Em lesões benignas e nas neoplasias intraepiteliais cervicais o vírus é encontrado na forma não integrada (epissomal) e está integrado ao genoma da célula hospedeira em cerca de 72 a 100% dos carcinomas invasivos cervicais e das linhagens celulares derivadas do câncer. Parece que a integração acontece após a infecção e persistência de tipos virais oncogênicos, e influencia a expressão do vírus e o comportamento biológico das células infectadas, além de possuir um papel importante na progressão e manutenção do estado neoplásico maligno (BORNSTEIN et al., 1995; PARK et al., 1995; SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

A integração ocorre em local não específico no genoma da célula hospedeira. Entretanto, alguns autores demonstraram a sua presença em sítios frágeis dos

cromossomos, além de outros próximos a oncogenes celulares como o *c-myc* e *N-myc*, acarretando em instabilidade cromossômica ou na ativação de oncogenes, levando à progressão da doença. No genoma viral a integração se faz em local específico, com ruptura do DNA na região dos genes E1-E2, os quais são responsáveis pelo controle da expressão dos genes E6 e E7, induzindo o aumento da transcrição destes genes (SWAN, VERNON, ICENOGLE, 1994; BORNSTEIN et al., 1995; PARK et al., 1995; WIKSTRÖM, 1995; SONNEX, 1998).

Apesar de importante, parece que a integração não é um evento necessário para a carcinogênese cervical, pois foram encontrados tumores contendo o DNA viral na forma episomal (PARK et al., 1995).

Tem sido demonstrada a interação entre os produtos proteicos dos genes E6-E7 de HPV oncogênicos com as proteínas reguladoras do crescimento celular, fornecendo um possível mecanismo de ação para a sua atividade oncogênica. Estas oncoproteínas virais são detectadas em baixas concentrações nas lesões benignas e nas neoplasias intraepiteliais de baixo grau e em níveis maiores nas lesões intraepiteliais de alto grau e nos carcinomas invasivos. As evidências que comprovam o papel das oncoproteínas E6-E7 nas neoplasias associadas ao HPV são (SWAN et al., 1994; SCHIFFMAN & BRINTON, 1995; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997):

- estão constantemente presentes nas células carcinomatosas;
- os seus mecanismos reguladores estão ausentes nas células neoplásicas;
- são capazes de immortalizar células levando ao crescimento celular descontrolado;
- promovem instabilidade cromossômica nas células hospedeiras induzindo a transformação celular.

A proteína E6 do HPV é capaz de se ligar ao produto proteico do gene P53 e o E7 ao PRB (gene do retinoblastoma) da célula hospedeira, os quais são genes supressores tumorais envolvidos no controle do crescimento e morte celular (HERRINGTON, 1995; PARK et al., 1995; WIKSTRÖM, 1995; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997).

A ligação da oncoproteína E6 com o produto proteico do gene P53 leva à degradação deste último, com desbloqueio da divisão celular e da síntese do DNA do

hospedeiro, induzindo a persistência e replicação de defeitos genéticos, instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações. Além da sua degradação, o E6 pode inibir a sua função reguladora através da ruptura ou diminuição da afinidade de ligação entre a p53 e o DNA celular. Os tipos virais de baixo risco também se ligam à proteína p53, embora com menor afinidade e não são capazes de degradá-la (HERRINGTON, 1995; PARK et al., 1995; WIKSTRÖM, 1995; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997). Foi demonstrado que o E6 é capaz de interagir com as proteínas celulares que regulam a replicação do DNA do hospedeiro e também com os receptores dos fatores de crescimento epidérmicos, além da ativação do promotor do oncogene *c-myc* (SONNEX, 1998).

A oncoproteína E7 associada ao pRB libera o fator da transcrição E2F normalmente ligado ao pRB, levando à ativação da transcrição de vários genes envolvidos no controle da proliferação celular. Na progressão dos tumores benignos para malignos, deve haver expressão aumentada da oncoproteína E7. Altos níveis de E7 inativam totalmente o pRB, enquanto que em baixa quantidade leva ao seu bloqueio parcial, sendo necessários eventos adicionais para que ocorra a transformação celular. A proteína E7 dos tipos virais oncogênicos se liga ao pRB com uma afinidade cinco a 20 vezes maior do que os tipos de baixo risco (VOUSDEN, 1994; HERRINGTON, 1995; LIU et al., 1995; PARK et al., 1995; WIKSTRÖM, 1995; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997).

A oncoproteína E7 sozinha causa imortalização de queratinócitos humanos, embora não seja necessária a sua ligação ao pRB (VOUSDEN, 1994). Além disso, o E6 isoladamente não é capaz de imortalizar células. Parece que o E6 potencializa o poder de imortalização do E7 (PARK et al., 1995). Entretanto, as células imortalizadas pelo E6-E7 *in vitro* não são malignas nas primeiras passagens das culturas. A presença do HPV não é suficiente para induzir a transformação maligna, sendo que a ação de anti-oncogenes e de outros mecanismos de controle celular, devem influenciar e regular a transcrição dos genes virais e as funções das suas oncoproteínas (HERRINGTON, 1995; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997; SONNEX, 1998). Assim, a perda da função protetora dos produtos dos genes supressores tumorais, em conjunto com eventos adicionais, como, por exemplo, outras infecções virais e a ativação de oncogenes, resultam em crescimento tumoral (BORNSTEIN et al., 1995; SONNEX, 1998).

## 2.2. FUMO

A maioria dos trabalhos relacionando o fumo ao carcinoma cervical mostra que ele não é um fator de risco independente quando se leva em conta a infecção por HPV, atuando em associação com o HPV ou sozinho, através de seus metabólitos com propriedades carcinogênicas induzindo a mutações, ou através da imunossupressão local (BORNSTEIN et al., 1995; DERCHAIN et al., 1995; HERRINGTON, 1995; SCHIFFMAN & BRINTON, 1995; FRANCO, 1996; VOOG, 1996; SONNEX, 1998).

Foi demonstrada em pacientes fumantes a diminuição do número de células de Langerhans apresentadoras de antígenos, localizadas no epitélio cervical, levando à persistência da infecção viral (HERRINGTON, 1995), embora não constatado por DERCHAIN et al. (1996).

## 2.3. INFECÇÕES ASSOCIADAS

O vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) parece contribuir através da imunossupressão (local ou sistêmica), além de ser capaz de aumentar a transcrição do papilomavírus humano (KAUFMAN, 1995; WIKSTRÖM, 1995).

Acredita-se que o vírus do herpes simples tipo 2 age em sinergismo com o HPV como iniciador ou promotor da neoplasia cervical. Tem poder de ativar a expressão dos genes E6/E7 e de alterar o crescimento das células imortalizadas por HPV 16/18 (BORNSTEIN et al., 1995; HERRINGTON, 1995; KAUFMAN, 1995; PARK et al., 1995).

## 2.4. HORMÔNIOS

A “região controladora longa” do HPV contém receptores para os hormônios esteróides (glicocorticóides, progesterona, estrógeno, etc.) que levam a um aumento da transcrição viral promovendo a sua replicação. Foi demonstrado que os hormônios também aumentam *in vitro* a capacidade de transformação das células infectadas por HPV (CRUM & BURKETT, 1989; BORNSTEIN et al., 1995; HERRINGTON, 1995; SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

O uso de anticoncepcionais orais tem sido inconsistentemente associado à infecção por HPV e parece estar mais relacionado às mudanças do comportamento sexual. É sugerido que o seu uso não aumenta o risco de se adquirir a infecção viral, mas que atua estimulando a atividade do HPV já instalado no hospedeiro, através de um efeito direto na transcrição e na expressão viral (SCHIFFMAN & BRINTON, 1995; SONNEX, 1998).

CRUM & BURKETT (1989) enfatizam que o estrógeno é capaz de favorecer a infecção viral através de um efeito direto no epitélio escamoso, ou através da alteração da resposta imune, esta última também promovendo a persistência e progressão da doença.

## 2.5. IMUNIDADE

A resposta à infecção viral é mediada por células. A importância da imunidade celular é sugerida pela observação de regressão espontânea em lesões contendo concentração local aumentada de linfócitos e macrófagos e da diminuição do número de células de Langerhans em fumantes e em pacientes HIV positivas.

O envolvimento da imunidade sistêmica tem sido demonstrado através da alta incidência de verrugas e de neoplasia intraepitelial cervical em pacientes imunodeprimidas como transplantados renais, gestantes e HIV positivos. Embora tenham também sido detectados anticorpos contra os genes “iniciais” e “tardios”, a sua presença parece não ter correlação com o comportamento clínico da lesão (HERRINGTON, 1995; WIKSTRÖM, 1995; SONNEX, 1998).

## 2.6. ONCOGENES

Estudos *in vitro* mostram que o HPV é capaz de cooperar com oncogenes para induzir a transformação celular. Os oncogenes aumentam a expressão e a amplificação gênica (SWAN et al., 1994) e estão envolvidos o H-*ras*, c-*fos* e o c-*myc*, entre outros (HERRINGTON, 1995; WIKSTRÖM, 1995).

Além disso, parece que é necessária a ligação da oncoproteína E6 com os oncogenes para que ocorra a inativação completa do produto proteico do gene supressor tumoral P53 (HERRINGTON, 1995).

*Em resumo*, embora o HPV ocupe uma posição central na carcinogênese cervical, apenas a sua presença não é capaz de induzir o desenvolvimento neoplásico, resultante de vários processos interligados. Assim, parece que a sua ação, levando à inativação das proteínas supressoras tumorais p53 e pRB, associada à ativação de oncogenes celulares, à interferência de fatores celulares envolvidos no controle da transcrição viral e ao escape da vigilância imunológica, resulta em transformação celular e neoplasia, sendo a infecção por HPV um evento inicial na imortalização celular e a ativação de oncogenes, um evento tardio na carcinogênese cervical (REID et al., 1987; SWAN et al., 1994; HERRINGTON, 1995). Não se sabe ao certo se a infecção viral e os eventos celulares envolvidos na transformação estão diretamente relacionados ou se são acontecimentos independentes e que quando ocorrem juntos na mesma célula levam à transformação celular (SWAN et al., 1994).

O reconhecimento do papel chave do HPV alterou os conceitos previamente estabelecidos para o carcinoma cervical. Ainda não está claro qual dos fatores são meros correlatos da infecção viral, quais os co-fatores que atuam somente na presença da infecção e quais são os fatores de risco independentes. Esforços têm sido feitos para reconsiderar cada um dos fatores previamente estabelecidos frente ao papel do papilomavírus humano na carcinogênese cervical. A investigação de co-fatores associados ao HPV e à neoplasia cervical dominará as pesquisas epidemiológicas do futuro, embora a sua necessidade possa variar entre diferentes regiões geográficas (SCHIFFMAN & BRINTON, 1995).

PONTÉN et al. (1995) acreditam que mesmo a presença do DNA do HPV em 100% dos casos de neoplasia intraepitelial e invasiva cervical não constitui prova de causalidade, não se podendo excluir a possibilidade de que a infecção por HPV seja muito comum e que por algum motivo, o vírus é capaz de permanecer mais tempo no epitélio neoplásico do que na mucosa normal. Estes autores enfatizam que para provar o seu papel causal é necessário se demonstrar que:

- o câncer não se desenvolve na ausência do vírus;
- a infecção por HPV precede o desenvolvimento da neoplasia;
- todas as neoplasias cervicais apresentam o vírus em algum estágio da doença;
- a prevenção da aquisição da infecção por HPV impede o desenvolvimento tumoral.

## II. OBJETIVOS DO TRABALHO

---

---

Estudando os casos diagnosticados como neoplasia intraepitelial vulvar grau III (NIV III) e carcinoma escamoso invasivo da vulva dos arquivos de patologia cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, no período compreendido entre 1983 e 1995, procedendo à revisão histológica, com a tomada de parâmetros morfológicos e à detecção dos papilomavírus humanos (HPV) pelas técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular *in situ* e da oncoproteína p53 por imuno-histoquímica, **objetivamos** relacionar os achados morfológicos, a presença do HPV, a detecção da proteína p53 e a idade das pacientes, nos grupos de pacientes:

1. Com neoplasia intraepitelial vulvar grau III (NIV III)
2. Com carcinoma escamoso invasivo vulvar
3. Com carcinoma escamoso superficialmente invasivo, e
4. Correlacionar os três grupos acima entre si.

### III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

#### 1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Através da revisão dos arquivos de patologia cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, no período compreendido entre 1983 a 1995, foram selecionadas 102 pacientes cujos diagnósticos histológicos estavam assim distribuídos: neoplasia intraepitelial vulvar grau III (38 pacientes), carcinoma escamoso superficialmente invasivo (nove pacientes) e carcinoma escamoso invasivo da vulva (55 pacientes) (ANEXO I).

Algumas pacientes apresentavam mais de um exame anatomopatológico, por vezes com diagnósticos histológicos diferentes. Entretanto, para a análise dos resultados consideramos o número total de pacientes e os diferentes exames anatomopatológicos correspondentes foram agrupados, levando-se em conta para a elaboração do diagnóstico final, o aspecto histológico de maior gravidade ou predominante conforme o caso.

Devido à baixa frequência das lesões intraepiteliais neoplásicas grau III e de carcinoma escamoso superficialmente invasivo da vulva, analisamos neste estudo todos os casos levantados no período de 1983 a 1995, representados por biópsias, ressecções de lesões ou peças de vulvectomias.

Incluímos também os casos previamente analisados (através de estudo imuno-histoquímico e de hibridização molecular *in situ*) em nosso trabalho anterior (ENGELMAN, 1994), embora cinco casos de NIV III e dois de carcinoma escamoso superficialmente invasivo tenham sido excluídos por desbaste total dos blocos, não sendo possível assim a realização da pesquisa da proteína p53 através da técnica da imuno-histoquímica.

Como havia numerosos casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva e a intenção, era a de coletar um número de casos semelhantes aos de NIV III para fins de comparação, selecionamos apenas as lesões de carcinoma invasor provenientes de peças de vulvectomias, possibilitando uma melhor amostragem do tecido neoplásico, com análise histológica mais detalhada da peça como um todo e diagnóstico final mais apurado. Assim, optamos por incluir neste estudo os casos levantados nos últimos cinco anos, período compreendido entre 1991 e 1995, considerando-se ser este um material mais recente e, portanto, melhor preservado.

A partir das requisições de exame anatomopatológico, foram registrados os dados clínicos, a idade das pacientes e as características (clínicas e/ou macroscópicas) das lesões.

Todos os espécimes analisados eram provenientes do material de rotina do serviço, fixados em formalina a 10% e submetidos aos procedimentos habituais para inclusão em parafina.

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina foram reavaliadas, revistos os critérios diagnósticos de acordo com as definições de neoplasia intraepitelial vulvar grau III, carcinoma superficialmente invasivo e invasivo da vulva, preconizadas pela Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD) (WILKINSON, 1990, 1991). Assim, consideramos como NIV III as lesões que apresentavam atipias celulares envolvendo mais de dois terços da espessura do epitélio; e como carcinoma superficialmente invasivo, lesões com profundidade de invasão menor ou igual a um milímetro. Se possível avaliar, levamos em conta também, o diâmetro menor ou igual a dois centímetros e as lesões que mostravam múltiplas áreas de invasão ou profundidade de invasão maior do que um milímetro, foram catalogadas como carcinoma invasor.

As variáveis analisadas foram: a idade das pacientes e etnia, o tipo de material enviado (biópsia, ressecção de lesão, vulvectomia), a presença de doenças do trato genital inferior associadas, os aspectos clínicos e/ou macroscópicos das lesões, a localização e multifocalidade das lesões, o diagnóstico histológico e variante histológica, a presença de sinais histológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humanos e as alterações epiteliais adjacentes à neoplasia.

Lesões multifocais foram definidas como aquelas contendo mais de uma lesão, localizadas na região vulvar e separadas por epitélio não neoplásico. Foram consideradas como multicêntricas aquelas apresentando lesões neoplásicas em outros locais do trato genital feminino inferior, além da região vulvar.

As alterações histológicas sugestivas de infecção viral que são detectadas principalmente no terço superior do epitélio incluem: coilocitose, bi- ou multinucleação, disceratose, hiperkeratose, parakeratose, acantose, alongamento dos cones epiteliais, papilomatose e hiperplasia da camada basal e parabasal do epitélio (VOOG, 1996; KLUZAK & KRAUS, 1987; KURMAN, NORRIS, WILKINSON, 1992). Quando todas estas alterações estavam presentes na lesão neoplásica ou no epitélio adjacente, elas foram classificadas como condiloma, acuminado ou plano. Entretanto, quando não havia todos os critérios para o diagnóstico de condiloma, classificamos estas alterações como coilocitose, com diferentes graus de intensidade, graduados de forma subjetiva levando-se em consideração a quantidade de células alteradas e o grau das atipias nucleares.

As variantes histológicas das neoplasias intraepiteliais vulvares grau III foram definidas como bowenóide, basalóide e diferenciado, sendo as lesões classificadas de acordo com o padrão predominante (KURMAN et al., 1992; COSTA et al., 1995; KAUFMAN, 1995):

- bowenóide: presença de atipias nucleares marcadas, com grande variação na forma e no volume dos núcleos, multinucleação e diskeratose;
- basalóide: células atípicas, relativamente uniformes, imaturas, semelhantes às células da camada basal do epitélio;
- diferenciado: presença de atipias nucleares ou pérolas córneas apenas na camada basal do epitélio, apresentando maturação normal nos dois terços restantes.

Além disso, avaliamos a presença de extensão da neoplasia para os anexos cutâneos nos casos de NIV III e carcinoma superficialmente invasivo e nestes últimos, também a profundidade de invasão estromal.

Os critérios histológicos utilizados para o diagnóstico de invasão tumoral foram (WILKINSON, 1987; KURMAN et al., 1992):

- presença de infiltrado inflamatório, fibrose ou edema na área de invasão;
- perda do arranjo em paliçada das células epiteliais ao nível da junção dermo-epidérmica, com crescimento epitelial desordenado;
- células escamosas isoladas se estendendo ao estroma subjacente e;
- aumento da eosinofilia citoplasmática das células invasoras.

A profundidade de invasão do tumor foi considerada como a medida perpendicular a partir da junção dermo-epidérmica da papila dérmica mais superficial adjacente ao tumor, até o ponto mais profundo da invasão tumoral, através de ocular calibrada, como recomendado pela Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD) (WILKINSON, 1990, 1991).

O carcinoma invasivo vulvar foi graduado, como preconizado pelo Grupo de Oncologia Ginecológica (KURMAN et al., 1992), de acordo com a porcentagem de células indiferenciadas presentes no tumor. Estas células são caracterizadas por serem pequenas, com citoplasma escasso e infiltram o estroma em pequenos blocos sólidos ou em arranjo cordonal. Assim, a neoplasia pode ser graduada em:

- Grau I: tumores que não apresentam células indiferenciadas;
- Grau II: presença de menos de 50% de células indiferenciadas;
- Grau III: tumores apresentando 50% ou mais de células indiferenciadas.

Os subtipos histológicos do carcinoma escamoso invasivo da vulva foram classificados como: queratinizante, não queratinizante, basalóide, verrucoso e condilomatoso, de acordo com as definições recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (SCULLY et al., 1994):

- queratinizante: células atípicas maduras, com citoplasma abundante e eosinófilo, com formação de pérolas de queratina de permeio à neoplasia;
- não queratinizante: presença de algumas células isoladas queratinizadas, porém não há formação de pérolas córneas;

- basalóide: células escamosas imaturas atípicas, uniformes, semelhantes às células da camada basal do epitélio, com citoplasma escasso e núcleo ovalado. Presença de maturação ou queratinização ocasional no centro dos blocos neoplásicos;
- verrucoso: células neoplásicas bem diferenciadas, com atipias celulares mínimas e citoplasma amplo e eosinófilo. Aspecto verrucoso, com invasão estromal de padrão compressivo;
- condilomatoso: células atípicas maduras, com características celulares de infecção viral (atipias coilocitóticas) e aspecto papilomatoso.

Quando presentes, os produtos de linfadenectomia foram analisados para a identificação de metástases ganglionares.

Foram selecionados os melhores blocos para a realização das técnicas especiais, levando-se em conta o tamanho do espécime, a presença de alterações histológicas sugestivas de infecção viral e de áreas histologicamente normais adjacentes às lesões. Os mesmos blocos foram utilizados para os métodos de detecção viral e da proteína p53. Estas técnicas foram repetidas quando necessário, até se conseguir um resultado considerado satisfatório para uma avaliação adequada, ou até o desbastamento total do bloco.

Estes estudos específicos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher-CAISM/FCM/UNICAMP.

## 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

A pesquisa do antígeno do capsídeo do papilomavírus humano e da proteína p53 foi realizada segundo os procedimentos habituais de imuno-histoquímica (HSU, RAINE, FANGER, 1981; TAYLOR et al., 1994; RESNICK et al., 1995; PILERI et al., 1997). A variante utilizada para a revelação do anticorpo primário ligado ao antígeno foi o método da estreptavidina-biotina-peroxidase (S-ABC) (Kit Dako, K-377).

A reação de imuno-histoquímica permite a localização de antígenos celulares conjugados a um anticorpo específico via enzima peroxidase. Uma substância geradora de cor contendo peróxido de hidrogênio é adicionada para reagir com a enzima peroxidase e precipita no local onde o antígeno está presente. São utilizados três reagentes principais: anticorpo primário específico para o antígeno a ser localizado, anticorpo secundário capaz de ligar-se ao primário e conjugado à biotina e, complexo de peroxidase conjugado a estreptavidina e biotina. O procedimento detalhado encontra-se nos ANEXOS II e III.

Foram utilizados controles para maior confiabilidade dos resultados. O controle positivo constou de um caso sabidamente positivo para a reação, colocado juntamente com a bateria de casos-teste em cada dia de reação. O controle negativo foi a mesma lâmina que a utilizada para controle positivo, onde colocou-se soro fisiológico em substituição ao anticorpo primário; o restante da reação foi idêntico aos casos-testes.

Os resultados foram analisados através do microscópio óptico comum. Foram considerados positivos para a pesquisa do antígeno viral, os casos que apresentaram pelo menos um núcleo nitidamente corado, de coloração acastanhada, em contraste com os azulados negativos corados pela hematoxilina e graduados de forma semiquantitativa como a utilizada para a proteína p53.

A imunodeteção da proteína p53 foi avaliada de forma semiquantitativa, baseada na intensidade e proporção de células coradas em relação às desprovidas de coloração (TERVAHAUTA et al., 1993; LAMBKIN, MOTHERSILL, KELEHAN, 1994; VASSALLO et al., 2000):

- ( - ) = reação negativa, ausência de células coradas;
- ( + ) = reação fracamente positiva, apresentando até 10% de células coradas;
- ( ++ ) = reação positiva, grau moderado, corando entre 10 e 50% das células;
- ( +++ ) = reação com positividade intensa, com mais de 50% das células coradas.

### 3. HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR IN SITU (HIS) (NAGAI et al., 1987)

Nesta técnica, foram utilizadas sondas de DNA específicas para os HPV's tipos 6/11, 16/18 e de amplo espectro (HPV's 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 e 52) (números de catálogo Y1411, Y1412 e Y1404, Dakopatts, USA), marcadas com biotina. A visualização da reação foi feita através da revelação da biotina ligada à sonda com o sistema CSA – Catalyzed System Amplification (número de catálogo K1500, Dakopatts, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Neste estudo incluímos também os casos previamente analisados em nosso trabalho anterior (ENGELMAN, 1994), cuja técnica de hibridização molecular *in situ* foi realizada através do “kit” comercial PathoGene, Enzo Diagnostics, Inc, New York (32877A e 32877B), contendo sondas biotinizadas para os HPV's tipos 6/11, 16/18 e 31/35/51, cujo procedimento é padronizado pelo fabricante e já anteriormente descrito (ENGELMAN, 1994).

O procedimento detalhado encontra-se nos ANEXOS II e III.

Foram utilizados controles positivos e negativos, para melhor confiabilidade dos resultados. O controle positivo constou de um caso sabidamente positivo para a reação, colocado juntamente com a bateria de casos-teste em cada dia de reação. O controle negativo foi a mesma lâmina que a utilizada para controle positivo, onde se colocou soro fisiológico em substituição às sondas biotinizadas utilizadas; o restante da reação foi idêntico aos casos-testes.

A visualização de um precipitado acastanhado intra-nuclear, indicador da presença do genoma viral na célula, foi realizada através de microscópio óptico comum. Foram considerados como positivos quando pelo menos um núcleo apresentava-se fortemente corado, em contraste com os azulados negativos corados pela hematoxilina e a intensidade da reação, graduada de forma semiquantitativa como a utilizada para a proteína p53.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do qui-quadrado foi empregado para a análise da associação entre as variáveis nos três grupos de pacientes incluídas no estudo. Quando necessário, isto é, na presença de um valor esperado menor do que cinco, utilizamos o teste exato de Fisher (FLEISS, 1981; BEIGUELMAN, 1991).

Para verificar quais das variáveis estudadas influenciavam a detecção do papilomavírus humano e da proteína p53, realizamos a análise de regressão logística não condicional (FLEISS, 1981; HOSMER & LEMESHOW, 1989a, 1989b).

A variável idade foi avaliada através do teste t de “Student” (BEIGUELMAN, 1991).

Consideramos como resultado estatisticamente significativo, quando obtivemos um valor de  $p \leq 0,05$ .

A análise estatística foi realizada em conjunto com o Serviço de Estatística da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, através dos programas de informática “Statistical Analysis System”, versão 6.12b (SAS Institute Inc, North Carolina, USA) e “EpiInfo”, versão 6.02b (Centers of Disease Control, Georgia, USA).

## IV. RESULTADOS

### 1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III (Anexo I)

Durante o período levantado, compreendido entre 1983 e 1995, foram identificadas 38 pacientes com o diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial vulvar grau III (Figura 1). Podemos observar que na década de 80, foram diagnosticados treze casos de NIV III e na década de 90, vinte e cinco.

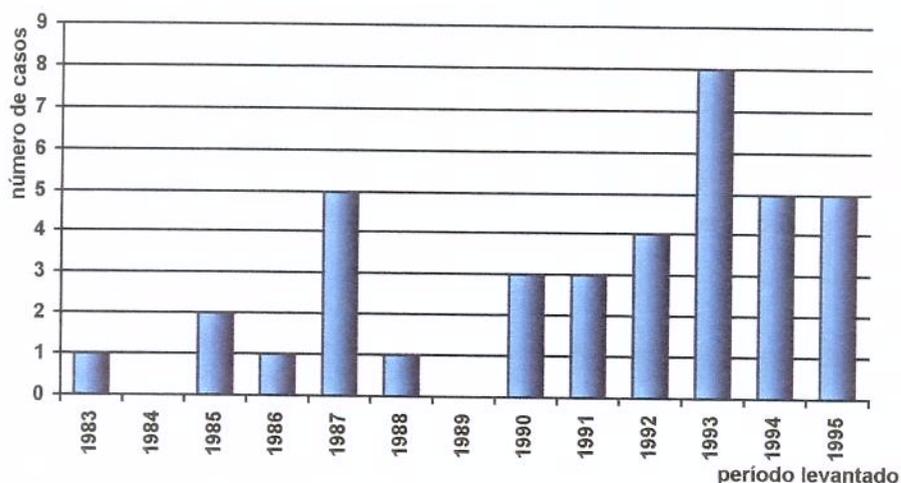


FIGURA 1 - Distribuição dos casos de NIV III, levantados entre 1983 e 1995

Como já previamente mencionado, sempre que disponíveis, analisamos os dados clínicos coletados a partir das requisições de exames anatomopatológicos como: idade das pacientes, etnia e presença de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior. Também avaliamos a localização, a focalidade e o aspecto macroscópico das lesões, através dos dados clínicos ou da análise anatomopatológica.

Através do exame microscópico foram identificadas as variantes histológicas, a presença de sinais histológicos sugestivos de infecção viral, a extensão da neoplasia para os anexos cutâneos e as alterações epiteliais adjacentes à neoplasia intraepitelial vulvar III.

### 1.1. DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA

As idades das pacientes estavam disponíveis em apenas 37 dos 38 casos em estudo e variou entre 15 e 82 anos, com idade média de 47,5 anos, desvio padrão de 19,9 e mediana de 43 anos, sendo que 45,9% delas apresentavam idade inferior ou igual a 40 anos (Figura 2).

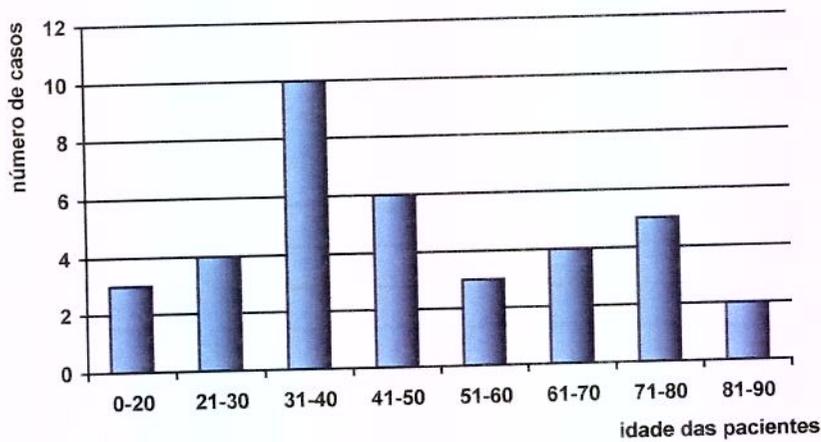


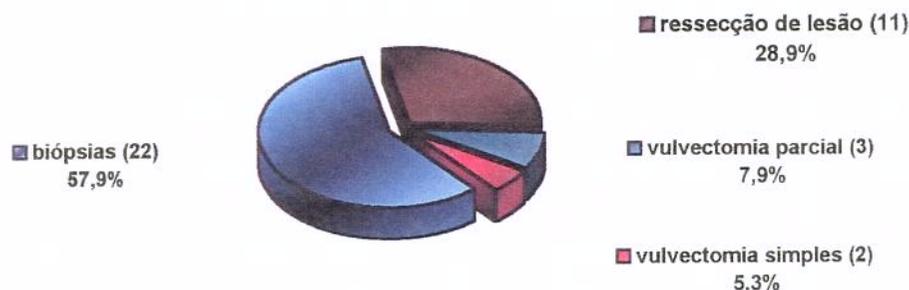
FIGURA 2 - Idade das pacientes com neoplasia intraepitelial grau III

### 1.2. ETNIA

Relatada em 32 dos 38 casos, sendo 24 (75%) caucasóides e oito (25%) afro-brasileiras ou descendentes.

### 1.3. TIPO DE CIRURGIA REALIZADA

Nove pacientes apresentavam mais de um exame anatomopatológico, seja por biópsia seguida de ressecção da lesão ou vulvectomia, seja por ampliação devido a envolvimento de margem cirúrgica. Nestas, consideramos a cirurgia mais ampla realizada, estando assim distribuídas (Figura 3):



**FIGURA 3 - Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos casos de NIV III**

#### 1.4. HISTÓRIA DE OUTRAS LESÕES ASSOCIADAS NO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

Das 38 pacientes em estudo, 14 (36,8%) apresentavam outras doenças do trato genital inferior associadas, progressas ou concomitantes, *discriminadas na história clínica das requisições de exame anatomopatológico*. O colo uterino foi o local mais freqüentemente afetado, ocorrendo em 11 casos (78,6%):

- um caso de condiloma do colo uterino;
- um condiloma do colo uterino associado a tricomoníase e VDRL positivo;
- um condiloma cervical associado a neoplasia intraepitelial vaginal grau II com condiloma e sorologia positiva para o HIV;
- gestante com citologia cérvico-vaginal classe III de Papanicolaou;
- um caso com citologia cérvico-vaginal classe III de Papanicolaou e molusco contagioso em vulva;
- dois casos de neoplasia intraepitelial cervical grau III;
- dois de carcinoma cervical invasivo;
- um caso de carcinoma invasivo do colo uterino e do terço distal da vagina;
- um com carcinoma invasivo do colo uterino associado a neoplasia intraepitelial vaginal grau III;

- um caso com condiloma de vagina;
- um com neoplasia intraepitelial vaginal grau III com condiloma;
- um caso onde a paciente tinha sorologia positiva para o HIV.

As 24 pacientes restantes, ou não apresentavam outras lesões associadas, ou estas não foram relatadas pelo clínico no preenchimento da requisição de exame.

A idade média das pacientes apresentando lesões multicêntricas foi de 44,8 anos, desvio padrão de 18,3 e mediana de 45 anos, enquanto que no grupo onde não foram relatadas outras lesões associadas foi de 48,9 anos, desvio padrão de 20,9 e mediana de 40,5 anos, não significativa do ponto de vista estatístico.

Cinco pacientes (35,7%) com lesões multicêntricas apresentavam condiloma e nove (64,3%), epitélio normal ou hiperplásico adjacente à neoplasia intraepitelial vulvar. O condiloma associado a NIV III não estava associado a multicentricidade.

### **1.5. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS LESÕES**

Foram coletados os dados macroscópicos das lesões a partir das descrições clínicas ou anatomopatológicas, que estavam relatados em apenas 24 casos e revelavam mais freqüentemente:

- oito pacientes (33,3%) apresentando apenas alterações cromáticas (quatro hipocrômicas, duas hiperocrômicas e duas com hipo- e hiperchromia);
- sete (29,2%) com lesões elevadas (pápulas ou nódulos) e com alterações discrômicas (três hipocrômicas, duas hiperocrômicas e duas com hipo- e hiperchromia);
- seis (25%) com lesões rugosas e/ou hiperkeratóticas, sendo que duas apresentavam alterações discrômicas associadas;
- duas (8,3%) referidas apenas como apresentando teste de Collins positivo;
- uma (4,2%) com lesão ulcerada.

O tamanho das lesões foi relatado em apenas oito casos, medindo a menor 0,4 cm e a maior 2,5 cm nos maiores eixos, com média de 1,6 cm na sua maior extensão.

## 1.6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

O local das lesões de NIV III foi relatado em 27 casos, sendo que em 15 pacientes (55,6%), apenas uma região da vulva estava envolvida e em 12 (44,4%), mais de um local e secundário a lesão extensa ou multifocal.

Assim, para identificar se havia predileção para determinada região da vulva, foram somados todos os locais referidos e identificamos a seguinte distribuição (Tabela 1):

**TABELA 1**  
**Distribuição das lesões de NIV III somando-se todas as regiões envolvidas**

| <b>Regiões vulvares envolvidas</b> | <b>Número de lesões (total = 50)</b> |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Grandes lábios                     | 15 (30%)                             |
| <i>lado não referido</i>           | 1                                    |
| <i>direito</i>                     | 8                                    |
| <i>esquerdo</i>                    | 6                                    |
| Pequenos lábios                    | 15 (30%)                             |
| <i>lado não referido</i>           | 1                                    |
| <i>direito</i>                     | 8                                    |
| <i>esquerdo</i>                    | 6                                    |
| Fúrcula                            | 11 (22,2%)                           |
| Cliitóris                          | 2 (4%)                               |
| Períneo                            | 2 (4%)                               |
| Vulva à direita                    | 1 (2%)                               |
| Vulva à esquerda                   | 1 (2%)                               |
| Às 9 e 12 horas                    | 1 (2%)                               |
| Perianal                           | 1 (2%)                               |
| Sulco interglúteo                  | 1 (2%)                               |

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

## 1.7. FOCALIDADE DAS LESÕES

As lesões foram classificadas como unifocais e multifocais baseando-se nos dados clínicos, na presença de biópsias múltiplas com identificação dos diferentes locais, ou após a avaliação histológica de ressecções ou vulvectomias que mostravam mais de um foco de neoplasia intraepitelial vulvar grau III separados por epitélio normal ou não neoplásico.

Dos 38 casos analisados, não foi possível avaliar a focalidade em 20 (52,6%). Os 18 restantes estavam assim distribuídos: 13 lesões multifocais (72,2%) e cinco (27,8%) unifocais.

A idade média das pacientes que apresentaram lesões multifocais foi de 55 anos, desvio padrão de 15 e as com lesões unifocais, 48,2 anos e desvio padrão de 23,9 (não significante do ponto de vista estatístico).

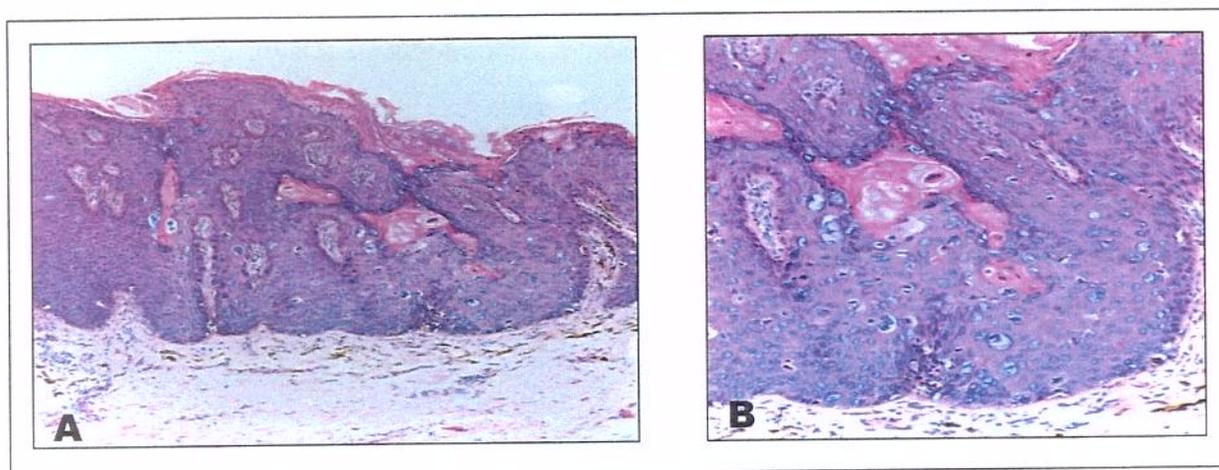
Lesão multicêntrica estava presente em quatro pacientes (30,8%) com NIV III multifocal e em quatro (80%) com NIV III unifocal (não significante estatisticamente).

Em relação às alterações epiteliais adjacentes no grupo com lesões multifocais, seis apresentavam condiloma e seis, hiperplasia escamosa ou epitélio normal, enquanto que nas pacientes com lesão unifocal, uma tinha condiloma e quatro epitélio normal ou hiperplásico (diferença não significante do ponto de vista estatístico).

## **1.8. VARIANTES HISTOLÓGICAS**

As variantes histológicas da neoplasia intraepitelial vulvar grau III estavam distribuídas em: 35 casos (92,1%) de padrão bowenóide (Figura 4) e três (7,9%) da variante basalóide (Figura 5). Nenhum caso foi diagnosticado como NIV III variante diferenciada.

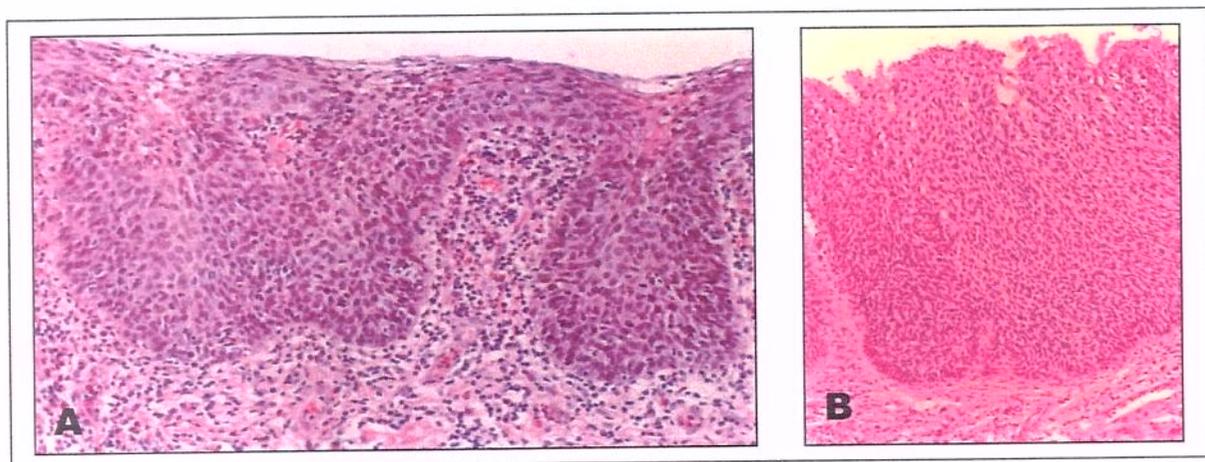
Mesmo nas pacientes com mais de um exame anatomopatológico, as variantes histológicas foram as mesmas nas diferentes biópsias, exceto um caso onde o diagnóstico inicial foi de variante basalóide na biópsia e na vulvectomia simples realizada posteriormente, bowenóide. Assim, na análise final, foi considerado como bowenóide, por ser o padrão histológico predominante na lesão.



**FIGURA 4 - Neoplasia intraepitelial vulvar grau III, variante bowenóide (B.4791/94, HE)**

A) Aumento 10x.

B) Pormenor, aumento 20x. Atipias nucleares marcadas, binucleações e mitoses.



**FIGURA 5 - Neoplasia intraepitelial vulvar grau III, variante basalóide**

A) B. 18719/88, HE, 20x

B) B. 61196/91, HE, 40x

As pacientes com a variante bowenóide apresentavam idade média de 47,7 anos e desvio padrão de 20,4 e as com padrão basalóide, 44,3 anos e desvio padrão de 15,5 (não significante estatisticamente).

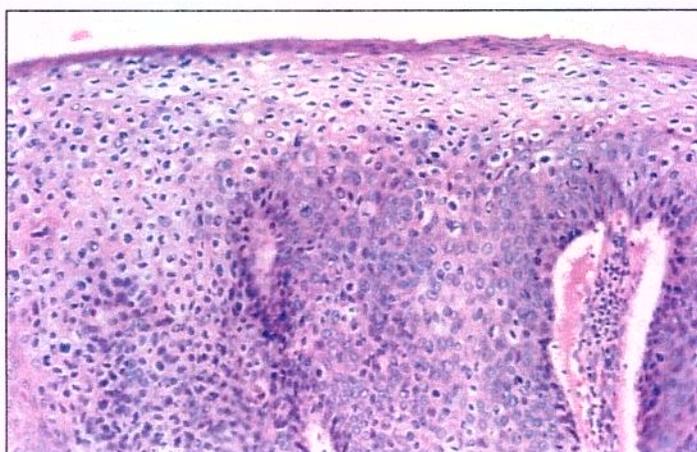
Dentre as 35 pacientes com a variante histológica bowenóide, 12 (34,3%) apresentavam outra lesão associada no trato genital inferior, 11 (31,4%) eram multifocais, 16 (45,7%) tinham lesão de condiloma associado e 17 (48,6%) epitélio adjacente normal ou hiperplásico.

Em relação à variante basalóide, duas (66,7%) tinham lesões multicêntricas, duas (66,7%) eram multifocais e nenhuma apresentava condiloma associado.

Considerando-se a presença de lesão multicêntrica, a focalidade das lesões e as alterações no epitélio adjacente à lesão de NIV III e comparando-as com ambas as variantes histológicas, a análise estatística não demonstrou significância.

### 1.9. SINAIS HISTOLÓGICOS SUGESTIVOS DE INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

Os sinais morfológicos sugestivos de infecção por HPV, isto é, alterações coilocitóticas, disqueratose e binucleação, além de outras alterações secundárias menos específicas como: hiperqueratose, paraceratose, acantose, hiperplasia da camada basal e parabasal do epitélio e papilomatose, foram identificados em 29 pacientes (76,3%), com intensidade variável (Figura 6).



**FIGURA 6 - Alterações coilocitóticas na superfície do epitélio de NIV III bowenóide (B.7325/93, HE, 20x)**

Na maioria dos casos, as alterações coilocitóticas foram identificadas no epitélio de NIV III e em alguns, também no epitélio adjacente não neoplásico. Apenas uma paciente apresentava alterações coilocitóticas somente no epitélio não atípico adjacente à lesão (Tabela 2).

**TABELA 2**  
**Intensidade e localização das alterações histológicas sugestivas de infecção viral nas lesões de NIV III**

|   | <i>Distribuição topográfica</i>      |  |   | <i>Total</i> |
|---|--------------------------------------|--|---|--------------|
|   | <i>Apenas no epitélio de NIV III</i> | <i>Apenas no epitélio adjacente não neoplásico</i> | <i>Epitélio de NIV III e adjacente não neoplásico</i> |              |
| <b><i>Alterações coilocitóticas</i></b> |                                      |  |   |              |
| leve (+)                                | 8                                    | 0  | 1   | 9 (31%)      |
| moderada (++)                           | 4                                    | 0  | 5   | 9 (31%)      |
| intensa (+++)                           | 2                                    | 1  | 8   | 11 (37,9%)   |
| <b><i>Total</i></b>                     | <b>14</b>                            | <b>1</b>   | <b>14</b>   | <b>29</b>    |

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

A idade média das pacientes apresentando alterações coilocitóticas foi de 49,5 anos e desvio padrão de 19,8 e das desprovidas de coilocitose, 41 anos e desvio padrão de 19,9, estatisticamente não significante. Também não foi significante quando correlacionamos com a intensidade das alterações coilocitóticas.

Do grupo contendo alterações coilocitóticas (29 casos), 11 (37,9%) apresentavam lesão multicêntrica, 12 (41,4%) multifocais; 28 (96,6%) casos eram da variante histológica bowenóide.

Dentre o grupo desprovido de coilocitose (nove casos), três (33,3%) tinham doença multicêntrica, uma (11,1%) lesão multifocal e sete (77,8%) da variante bowenóide.

Comparando-se estes dados entre as pacientes apresentando ou não alterações coilocitóticas, não observamos diferença do ponto de vista estatístico. Entretanto, pudemos observar que dentre três pacientes apresentando a variante histológica basalóide, duas não tinham coilocitose e uma apenas de grau leve.

Em relação ao epitélio adjacente à lesão de NIV III, dentre as 18 pacientes com epitélio normal ou hiperplásico, dez (55,6%) apresentavam alterações coilocitóticas, sendo de grau leve em sete (70%).

## 1.10. EXTENSÃO PARA OS ANEXOS CUTÂNEOS

Apenas 24 dos 38 casos apresentavam anexos cutâneos nos cortes histológicos para avaliação. Destes, foi observada extensão da neoplasia em nove casos (37,5%): seis (66,7%) somente para folículos pilosos, um (11,1%) para pêlos e glândulas sebáceas, um (11,1%) para pêlos e glândulas mucosas e um (11,1%) somente para glândulas sebáceas.

## 1.11. ALTERAÇÕES EPITELIAIS ADJACENTES ÀS LESÕES DE NIV III

Dentre os 38 casos com diagnóstico de NIV III, em três o espécime estava representado apenas pelo epitélio neoplásico, não sendo possível, assim, a avaliação do epitélio não atípico adjacente.

O epitélio adjacente ao NIV III nos 35 casos passíveis de análise apresentou-se:

- em 16 casos (45,7%) com epitélio normal, isto é, sem alterações;
- em dois casos (5,7%) com hiperplasia escamosa;
- em 16 casos (45,7%) com condiloma, sendo sete acuminados (Figura 7) e nove do tipo condiloma plano;
- em um (2,9%) com alterações coilocitóticas leves.

Assim, observamos que dos 19 casos contendo lesão no epitélio adjacente, 17 (89,5%) apresentavam alterações histológicas sugestivas de infecção por HPV e apenas dois (10,5%) hiperplasia escamosa.

A idade média das pacientes apresentando lesão de condiloma foi de 47,9 anos, desvio padrão de 21,1 e mediana de 45 anos, e a do grupo com epitélio adjacente normal ou hiperplásico, 49,2 anos com desvio padrão de 20,3 e mediana de 44 anos, não significante do ponto de vista estatístico.

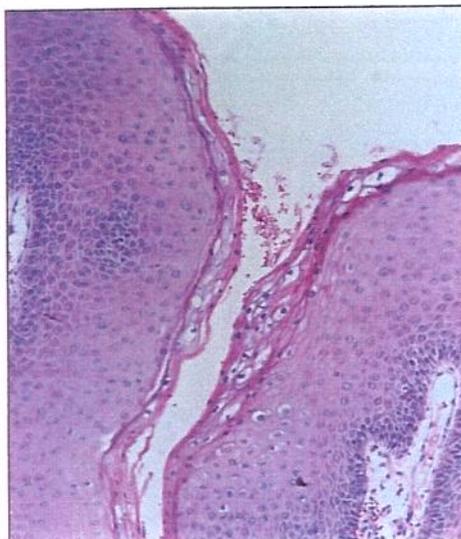


FIGURA 7 – Condiloma acuminado adjacente a NIV III bowenóide (B.11362/87, HE, 40x)

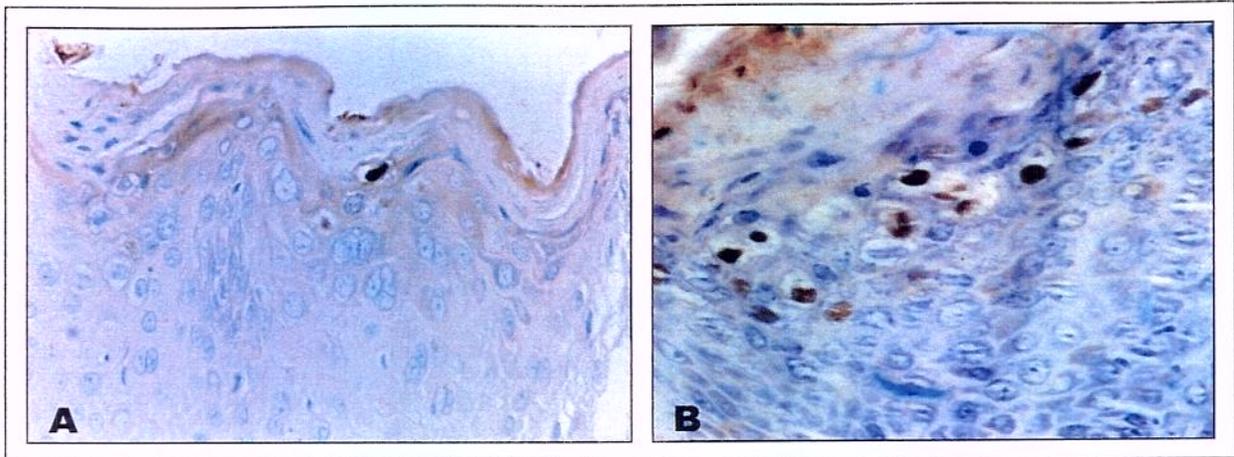
#### 1.12. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A pesquisa do antígeno do capsídeo dos papilomavírus humanos foi positiva em 13 dos 38 casos analisados (34,2%) e identificada nas camadas mais superficiais do epitélio, de condiloma ou de NIV III, junto às áreas de paraceratose e coilocitose (Figuras 8 e 9). Entretanto, a distribuição e o número de células positivas foram muito variados, sendo que a maioria dos casos apresentava poucos núcleos corados e de distribuição focal (Figuras 8 e 9), predominantemente no epitélio atípico.

A intensidade da reação foi de grau leve em nove casos (69,2%), moderado em três (23,1%) e intenso um (7,7%).

Quanto à localização do sinal positivo, este estava presente somente no epitélio do condiloma adjacente em dois casos (15,4%), embora ambos apresentassem alterações coilocitóticas de grau intenso no epitélio de NIV III.

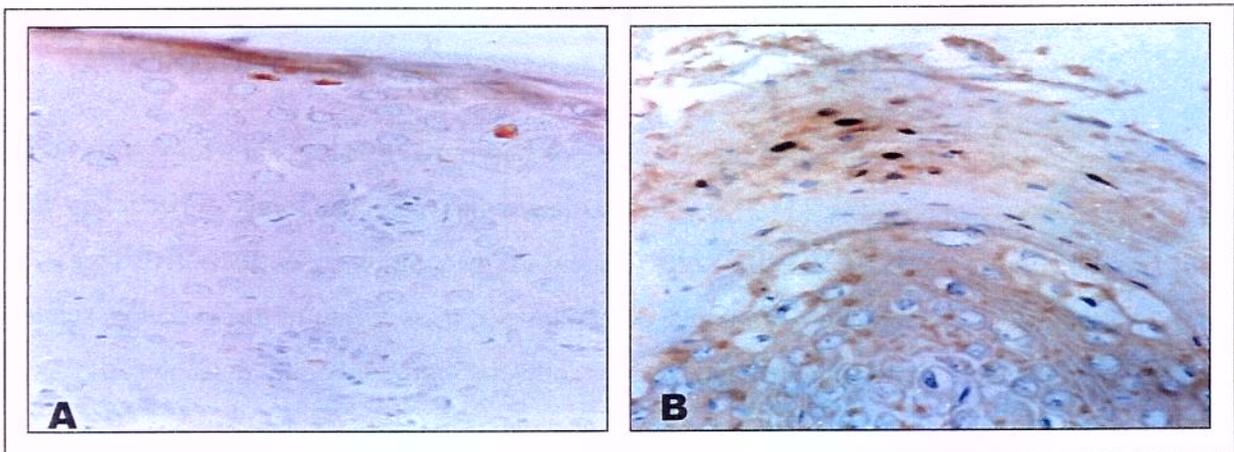
Oito casos (61,5%) foram positivos apenas no epitélio de NIV III (Figura 8), sendo que dois apresentavam lesão de condiloma no epitélio adjacente (Figura 9). Em três (23,1%) a reação positiva estava presente no NIV III e condiloma adjacente, sendo de coloração mais intensa na lesão de condiloma e menos acentuada no epitélio atípico.



**FIGURA 8 - Reação positiva para o antígeno viral na superfície do epitélio de NIV III (IHQ)**

A) em célula coilocitótica isolada (B.11741/94, 40x)

B) em várias células contendo alterações coilocitóticas (B. 2051/86, 40x)



**FIGURA 9 - Reação positiva para o antígeno viral no terço superior do epitélio de condiloma acuminado adjacente à NIV III (IHQ)**

A) em células isoladas (B.11741/94, 40x)

B) em células paraceratóticas (B. 11362/87, 40x)

O epitélio adjacente à lesão de NIV III nos casos positivos estava representado por epitélio normal em cinco (38,5%) e sete (53,8%) por condiloma. Um caso era constituído apenas por epitélio atípico.

Quatro pacientes (30,1%) tinham lesões multicêntricas e três (23,1%) multifocais. Em todas, a variante histológica presente era de padrão bowenóide.

Dos 13 casos positivos à imuno-histoquímica, oito (61,5%) foram também positivos pela hibridização molecular *in situ* (um em grau leve, três moderado e quatro intenso) e três (23,1%) para a p53, todos com intensidade leve.

A idade média do grupo positivo foi de 43,7 anos e desvio padrão de 20,5 e a do grupo negativo 49,5 anos, com desvio padrão de 19,7 (diferença não significativa estatisticamente).

Analisando-se a presença de alterações coilocitóticas nos 25 casos com reação imuno-histoquímica negativa, observamos que sete (28%) não apresentavam coilocitose, enquanto ela estava presente em 18 lesões (72%) (sete de grau leve, seis moderado e intenso em cinco casos).

Quanto às alterações epiteliais adjacentes ao NIV III nos casos negativos, o epitélio era normal em 11 (44%), nove (36%) apresentavam condiloma, um (4%) tinha alterações coilocitóticas leves e dois (8%) hiperplasia escamosa. Em dois casos (8%) não havia epitélio não neoplásico no espécime para avaliação.

Das 25 pacientes com reação imuno-histoquímica para HPV negativa, dez (40%) apresentavam lesões multicêntricas e dez (40%) multifocais; 22 (88%) eram de padrão bowenóide e três (12%) da variante basalóide.

Quanto ao resultado pela técnica de hibridização molecular *in situ*, 16 (64%) foram negativos e nove (36%) positivos, sendo dois em grau leve, quatro moderado e três intenso. A proteína p53 foi detectada em cinco casos (20%), todos com leve grau de intensidade.

Comparando-se a idade média, a presença de lesões multicêntricas e multifocais, a variante histológica, as alterações epiteliais adjacentes à lesão de NIV III e os resultados da hibridização molecular *in situ* e da pesquisa da proteína p53 entre os grupos de pacientes com imuno-histoquímica positiva e negativa para a pesquisa do antígeno do capsídeo viral, não detectamos diferenças significantes através da análise estatística. Entretanto, pudemos observar que todos os quatro casos cuja intensidade da reação da imuno-histoquímica foi de grau moderado a intenso foram também positivos pela técnica de hibridização molecular *in situ*. Os casos com imuno-histoquímica de grau leve

apresentaram distribuição semelhante entre os resultados positivos e negativos através da hibridização molecular *in situ*.

É interessante notar a correlação entre o resultado e a intensidade da reação imuno-histoquímica com o tipo de HPV presente nas lesões ( $p = 0,02$ ). Dos doze casos contendo apenas o HPV tipo 16/18, nove (75%) eram negativos e três (25%) positivos (dois em grau leve e um moderado). Dentre os quatro casos com infecção mista, todos foram positivos para a detecção do antígeno do capsídeo viral (um em grau leve, dois moderado e um intenso). O mesmo ocorreu com o único caso contendo apenas o HPV tipo 6/11.

Embora a presença ou ausência de alterações coilocitóticas não estivesse associada ao resultado do exame imuno-histoquímico, a intensidade da coilocitose estava relacionada com a positividade da técnica ( $p = 0,03$ ): dos casos com alterações coilocitóticas leves, seis foram negativos e três positivos. Dos casos com coilocitose moderada, oito foram negativos e um positivo. No grupo com coilocitose intensa, quatro foram negativos e sete positivos.

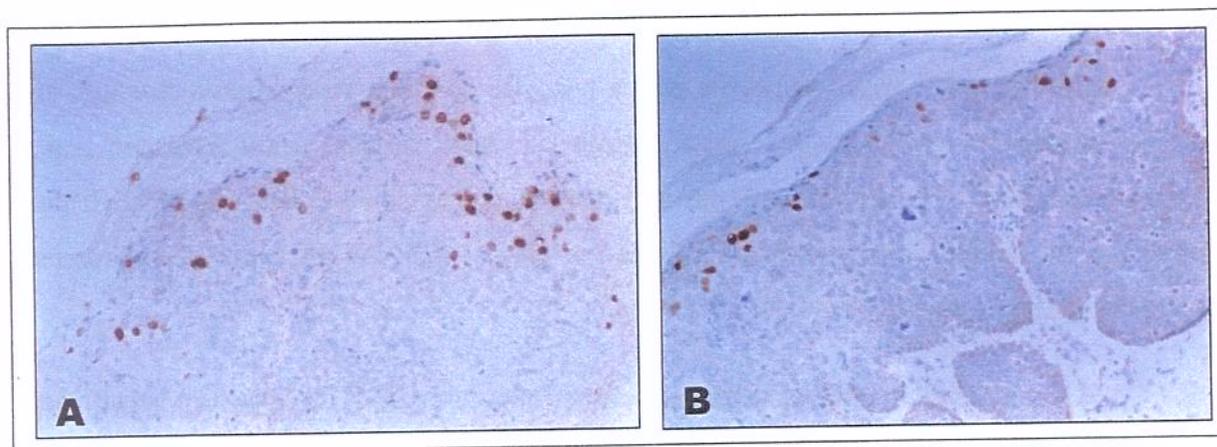
A presença de condiloma, epitélio normal ou hiperplásico adjacente às lesões de NIV III não mostraram diferença no resultado positivo ou negativo da reação imuno-histoquímica, embora tenhamos observado que 43,7% das lesões contendo condiloma e apenas 26,4% dos casos com epitélio normal ou hiperplásico foram positivas, todos em grau leve. Além disso, a relação entre a intensidade da reação e o tipo de alteração histológica presente no epitélio adjacente foi significativa ( $p = 0,04$ ).

### **1.13. DETECÇÃO DO DNA VIRAL ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU***

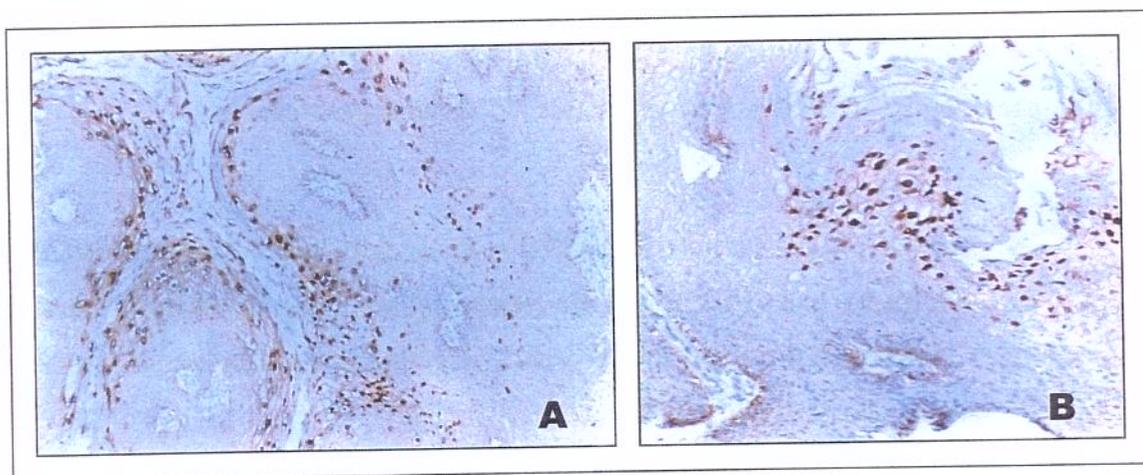
Reação positiva para a presença do DNA viral ocorreu em 17 dos 38 casos (44,7%). Se considerarmos apenas os tipos virais oncogênicos de alto risco, isto é, o HPV 16/18, eles estavam presentes em 16 casos (42,1%).

A positividade da reação foi mais freqüente e intensa no terço superior do epitélio de NIV III (Figura 10) ou em epitélio não neoplásico adjacente (Figura 11), em células com ou sem alterações coilocitóticas. Em poucos casos houve também coloração de alguns núcleos da camada intermediária, com menor grau de intensidade.

A intensidade da reação foi variável, sendo de grau leve em três casos (17,6%), moderado em sete (41,2%) e intenso em sete casos (41,2%).



**FIGURA 10** – Hibridização molecular *in situ* positiva para o HPV 16/18 no terço superior do epitélio com NIV III bowenóide, em células desprovidas de coilocitose (B.363/95, HIS, 20x). A e B - diferentes lesões em uma mesma paciente



**FIGURA 11** – Hibridização molecular *in situ* positiva para o HPV 6/11 no terço superior do epitélio, em lesão de condiloma acuminado adjacente à NIV III (B.6873/95, HIS). Aumentos: 10x (A) e 20x (B)

Dentro do grupo de pacientes com reação positiva, observamos que 13 (76,5%) apresentavam alterações coilocitóticas (duas de grau leve, três moderado e oito intenso).

Quanto às alterações epiteliais adjacentes à lesão de NIV III nos casos positivos, dez (58,8%) tinham condiloma, um (5,9%) hiperplasia escamosa e cinco

(29,4%), epitélio normal. Seis pacientes (35,3%) apresentavam lesões multicêntricas, três (17,6%) multifocais, 16 (94,1%) eram da variante bowenóide e uma basalóide. Oito (47,1%) foram positivos para o antígeno do capsídeo viral e cinco (29,4%) para a p53.

Dentre os 21 casos negativos para a pesquisa do DNA viral, observamos que 16 (76,2%) apresentavam alterações coilocitóticas de grau variado (grau leve em sete, moderado em seis, e intenso em três casos); localizadas apenas no epitélio de NIV III em dez casos, no epitélio atípico e de condiloma em cinco e no NIV III e epitélio adjacente contendo apenas coilocitose leve em um caso.

Quanto às alterações epiteliais adjacentes à lesão de NIV III nos casos negativos, elas estavam representadas por epitélio normal em doze casos (57,1%), com condiloma em cinco (23,8%), coilocitose discreta em um (4,8%) e hiperplasia escamosa em um (4,8%). Dois casos (9,5%), não apresentavam epitélio não neoplásico adjacente para avaliação.

Oito pacientes (38,1%) apresentavam lesões multicêntricas, dez (47,6%) multifocais e 19 (90,5%) eram da variante histológica bowenóide. Cinco (23,8%) foram positivos para o antígeno do capsídeo viral e três (12%) para a proteína p53.

A presença ou ausência de alterações coilocitóticas não estava relacionada ao resultado da hibridização molecular *in situ*. Entretanto, observamos significância estatística entre o grau de coilocitose e o resultado positivo e negativo, e também com a intensidade de positividade da reação de HIS ( $p=0,05$ ).

Observamos que a presença de condiloma ou epitélio normal adjacente à lesão de NIV III também estava relacionada com o resultado positivo ou negativo da reação, nos limites da significância estatística ( $p = 0,09$ ).

A idade média das pacientes com reação positiva foi de 38,8 anos com desvio padrão de 17,6 e do grupo negativo, 54,8 anos e desvio padrão de 19,1, diferença significativa através do teste *t* de “Student” ( $p = 0,02$ ).

Através da análise multivariada, observamos que as variáveis idade e alteração do epitélio adjacente à neoplasia intraepitelial, continuaram associadas à detecção do DNA

viral, onde grupos de pacientes mais jovens ( $p=0,03$ ) e contendo condiloma associado à lesão de NIV III ( $p=0,07$ ) apresentam índice maior de positividade pela reação de hibridização molecular *in situ*.

Lesões multicêntricas e multifocais, o padrão histológico do NIV III, a presença do antígeno viral e da proteína p53, não estavam associados à detecção do DNA do HPV.

Em relação aos tipos específicos de HPV nos 17 casos positivos, identificamos:

- tipo 16/18 em 12 casos (70,6%), localizados apenas no epitélio de NIV III em dez e no epitélio de NIV III e de condiloma adjacente em dois casos;
- tipo 6/11 em apenas um caso (5,9%), presente na lesão de NIV III e de condiloma adjacente;
- infecção mista em quatro casos (23,5%), assim distribuídos:
  - \* um contendo os HPVs tipos 16/18 e 31/35/51, localizados apenas no epitélio de NIV III;
  - \* três casos com os HPVs tipos 16/18 e 6/11, sendo que:
    - . em um caso, os dois tipos virais estavam localizados no epitélio de NIV III e condiloma adjacente;
    - . tipo 16/18 presente no NIV III e o 6/11 na lesão de NIV III e condiloma;
    - . tipo 16/18 no NIV III e 6/11 apenas na lesão de condiloma adjacente.

Comparando-se as pacientes apresentando o HPV tipo 16/18 com o grupo contendo infecção mista em relação aos parâmetros: idade média, a presença de lesões multicêntricas e multifocais, alterações coilocitóticas, variante histológica, as alterações do epitélio adjacente ao NIV III e a detecção do antígeno do capsídeo viral e da proteína p53, não observamos diferenças significativas estatisticamente, exceto para a detecção do antígeno do capsídeo viral. Todas as pacientes apresentando infecção mista apresentavam reação positiva para o antígeno viral, enquanto que das contendo HPV do tipo 16/18, três (25%) foram positivas e nove (75%) negativas através da técnica de imuno-histoquímica ( $p = 0,02$ ).

Embora não significante do ponto de vista estatístico, observamos que todas as pacientes com infecção mista apresentavam condiloma adjacente à lesão de NIV III.

### 1.14. RELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU* PARA A DETECÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

Dentre os 38 casos de NIV III analisados, 22 (57,9%) foram positivos para a pesquisa do HPV através das técnicas de imuno-histoquímica ou hibridização molecular *in situ*. Entretanto, somente oito casos (36,4%) foram concordantes, isto é, positivos para ambos os métodos (Tabela 3) e localizados na mesma região do fragmento.

**TABELA 3**

**Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular *in situ* para a detecção dos papilomavírus humanos nas lesões de NIV III**

|                           | <u>Hibridização molecular <i>in situ</i></u> |                 | <i>Total</i> |
|---------------------------|--|-----------------|--------------|
|                           | Casos positivos                              | Casos negativos |              |
| <u>Imuno-histoquímica</u> |  |                 |              |
| Casos positivos           | 8  | 5               | 13           |
| Casos negativos           | 9  | 16              | 25           |
| <i>Total</i>              | 17   | 21              | 38           |

$p (\chi^2) = 0,24$

HPV: papilomavírus humanos

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

A tabela abaixo (Tabela 4) mostra os principais achados nos grupos de pacientes com resultado positivo e negativo para a pesquisa de papilomavírus humanos.

**TABELA 4**

**Relação entre detecção do papilomavírus humanos e as variáveis analisadas**

| <i>Variáveis</i>      | HPV positivo (22 casos) | HPV negativo (16 casos) | Significância estatística |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Idade média           | 40,8 anos (DP 18,4)     | 57,3 anos (DP 18,4)     | $p = 0,02$                |
| Lesões multicêntricas | 8 (36,4%)               | 6 (37,5%)               | NS                        |
| Lesões multifocais    | 4 (18,2%)               | 9 (56,3%)               | NS                        |
| Variante bowenóide    | 21 (95,5%)              | 14 (87,5%)              | NS                        |
| Presença de condiloma | 10 (45,5%)              | 6 (37,5%)               | NS                        |
| p53                   | 6 (27,3%)               | 2 (12,5%)               | NS                        |

HPV: papilomavírus humanos

DP: desvio padrão

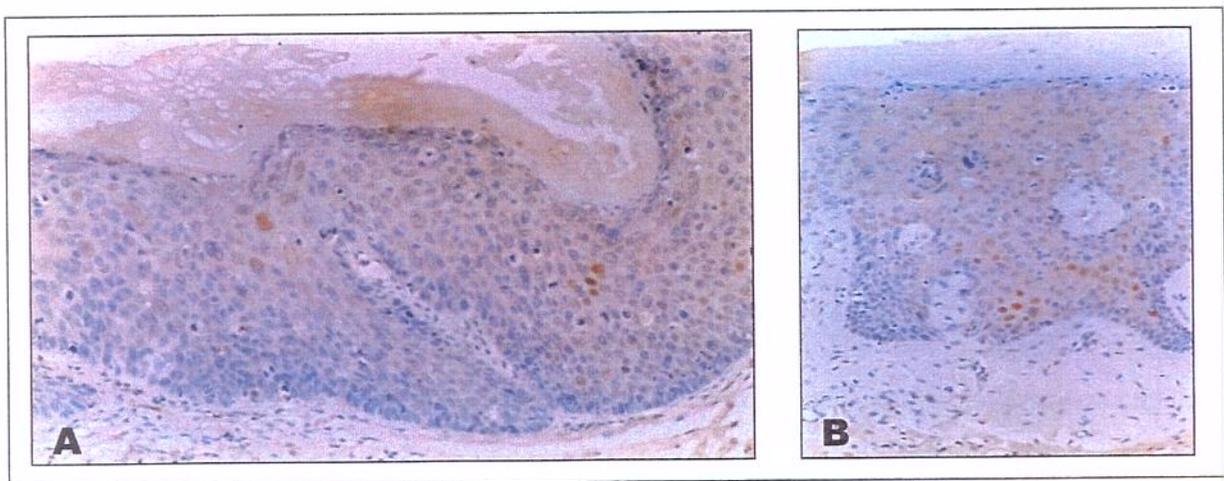
NS: não significante ( $p > 0,05$ )

A diferença entre as idades médias das pacientes com resultado positivo ou negativo para a pesquisa do papilomavírus humano, detectado através de uma das técnicas, foi significativa do ponto de vista estatístico pelas análises univariada e multivariada ( $p = 0,02$ ), onde pacientes mais jovens possuem maiores índices de detecção do HPV.

### 1.15. DETECÇÃO DA PROTEÍNA P53 ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A reação para pesquisa da proteína p53 foi positiva em oito de 38 casos (21,1%), todos de intensidade leve e localizada no epitélio atípico de NIV III. Entretanto, em um caso também foi observada positividade nuclear na lesão de condiloma adjacente.

Em cinco casos, o padrão de coloração era de distribuição focal (Figura 12), sendo que em dois estava restrito ao terço inferior do epitélio e em três, comprometia toda a sua espessura. Três apresentavam distribuição mais difusa na lesão, um deles ocupando toda a espessura do epitélio, outro a metade inferior e o terceiro caso, apenas a camada basal.



**FIGURA 12 – Reação positiva focal para a proteína p53 em NIV III bowenóide (IHQ, 20x).**

A) B. 9154/94

B) B. 29930/89

Em relação às alterações coilocitóticas nos casos positivos para a proteína p53, elas estavam presentes em todos os casos, em grau variado (quatro de grau leve, dois moderado e dois intenso), localizadas apenas no epitélio de NIV III em quatro casos e no NIV III e condiloma adjacente em quatro.

Quanto às alterações do epitélio adjacente, quatro (50%) apresentavam lesões de condiloma e quatro (50%) não mostravam alterações.

Uma paciente (12,5%) apresentava lesão multicêntrica, três (37,5%) multifocais e todas eram da variante histológica bowenóide.

O papilomavírus estava presente em seis casos (75%), tendo sido concomitantemente identificado através de ambos os métodos de detecção viral em dois (33,3%). Nos quatro casos restantes, a reação foi positiva para a pesquisa do antígeno do capsídeo em um e para o DNA viral em três (Tabela 5).

**TABELA 5**  
**Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos nas lesões de NIV III**

|              | p53 negativo | p53 positivo | Total |
|--------------|--------------|--------------|-------|
| HPV negativo | 14           | 2            | 16    |
| HPV positivo | 16           | 6            | 22    |
| <b>Total</b> | 30           | 8            | 38    |

*p* (Fisher) = 0,24

HPV: papilomavírus humano

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

Quanto aos 30 casos p53-negativos, observamos que nove (30%) não apresentavam alterações coilocitóticas, enquanto ela estava presente em 21 casos (70%) com intensidade variável (cinco de grau leve, sete moderado e nove intenso), localizadas no epitélio de NIV III em nove casos, no NIV III e epitélio de condiloma adjacente em dez, somente no condiloma em um e na lesão de NIV III e epitélio adjacente normal em um caso.

Destes, doze (40%) apresentavam condiloma no epitélio adjacente, dois (6,7%) hiperplasia escamosa e treze (43,3%) não demonstravam alterações adjacentes à lesão de NIV III. Em três, o espécime era constituído apenas pela neoplasia intraepitelial grau III.

Dez casos (33,3%) foram positivos para a pesquisa do antígeno viral e doze (40%) para o DNA do papilomavírus humano, sendo que seis casos (20%) foram positivos para ambas as técnicas de detecção viral e 16 (53,3%) por um ou outro método (Tabela 5).

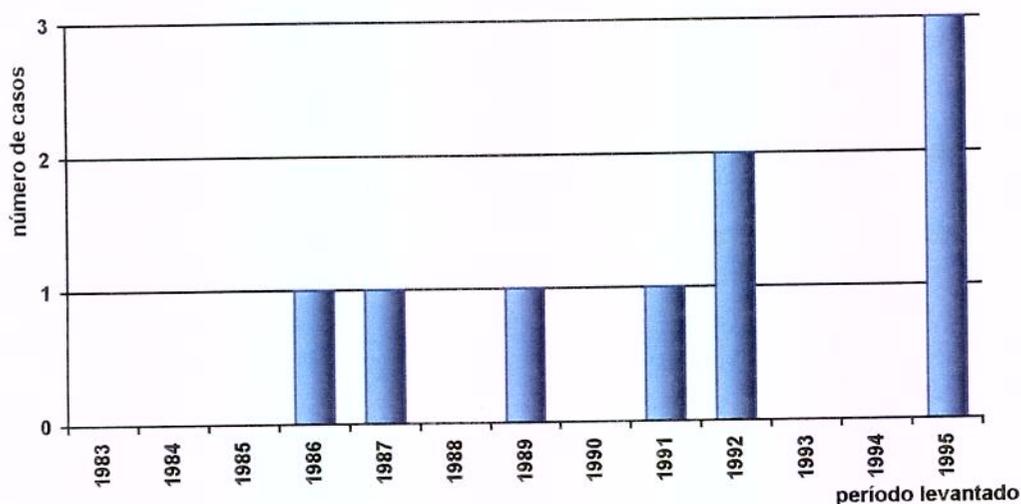
Treze pacientes (43,3%) apresentavam outras patologias associadas no trato genital feminino inferior, dez (33,3%) tinham lesões multifocais e 27 (90%) eram de padrão bowenóide.

A idade média das pacientes com exame positivo para a detecção da proteína p53 foi de 45,4 anos e desvio padrão de 21,6 e do grupo negativo, 48 anos e desvio padrão de 19,8, não significante pela análise estatística.

Nenhum dos dados analisados estavam relacionados à detecção da proteína p53.

## 2. CARCINOMA SUPERFICIALMENTE INVASIVO DA VULVA (Anexo I)

Durante o período levantado, compreendido entre 1983 e 1995, foram identificadas nove pacientes com diagnóstico de carcinoma escamoso vulvar superficialmente invasivo, sendo que três casos ocorreram na década de 80 e seis na década de 90 (Figura 13).



**FIGURA 13 - Distribuição dos casos de carcinoma escamoso vulvar superficialmente invasivo, levantados entre 1983 e 1995**

Como já referido na análise dos resultados para a neoplasia intraepitelial vulvar grau III, coletamos a partir das requisições de exame anatomopatológico, os dados clínicos pertinentes como: a idade das pacientes, etnia e a presença de outras patologias associadas no trato genital no inferior. Também avaliamos a localização, focalidade e o aspecto macroscópico das lesões.

Através do exame histológico, analisamos a presença de sinais sugestivos de infecção viral, a extensão da neoplasia para os anexos cutâneos, as alterações do epitélio adjacente à lesão, a profundidade de invasão estromal, além da identificação de metástases ganglionares quando realizada a linfadenectomia.

A detecção do papilomavírus humanos foi realizada através das técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular *in situ* e da p53, identificada através da imuno-histoquímica.

## 2.1. DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA

A idade das pacientes variou de 37 a 88 anos, com média de 57,9 anos e desvio padrão de 16,6, sendo que somente duas (22,2%) apresentavam idade inferior ou igual a 40 anos (Figura 14).

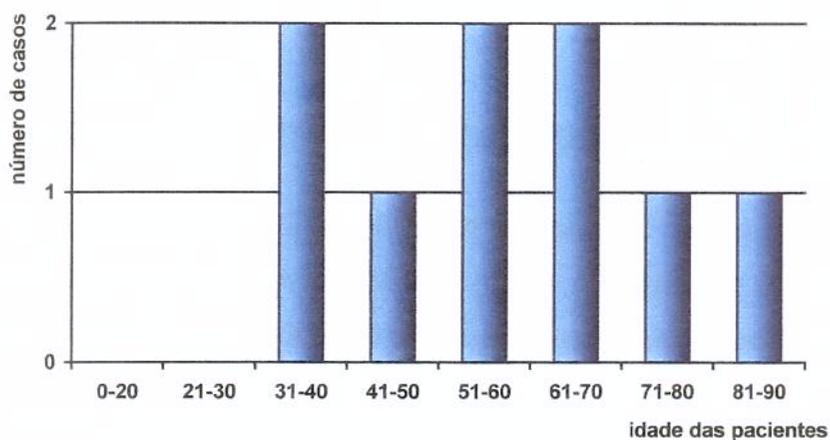


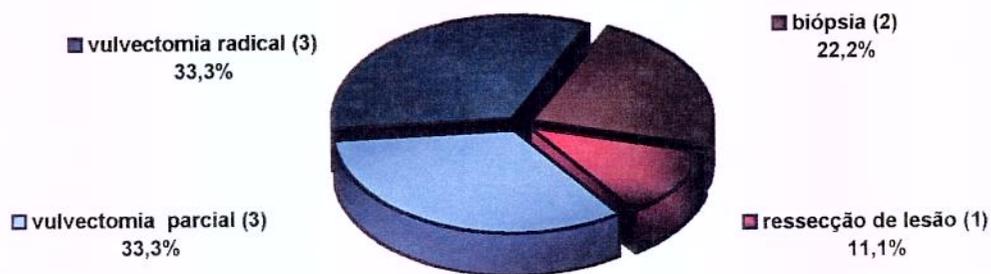
FIGURA 14 - Idade das pacientes com carcinoma superficialmente invasivo da vulva

## 2.2. ETNIA

A etnia foi relatada em apenas oito casos. Destas, sete (87,5%) eram caucasóides e uma (12,5%), afro-brasileira.

## 2.3. TIPO DE CIRURGIA REALIZADA

As peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico estavam assim distribuídas (Figura 15):



**FIGURA 15 - Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos casos de carcinoma superficialmente invasivo da vulva**

## 2.4. HISTÓRIA DE OUTRAS LESÕES ASSOCIADAS NO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

Dentre as nove pacientes em estudo, foram identificadas cinco (55,6%) apresentando outras patologias no trato genital inferior associadas à lesão vulvar. As outras quatro, ou não tinham outras lesões associadas, ou não foram relatadas pelo clínico.

O colo uterino foi o local mais envolvido, ocorrendo em quatro casos (80%). Uma paciente apresentava lesão vaginal (20%), estando assim distribuídas:

- duas pacientes com diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC III - displasia grave/carcinoma *in situ*);
- uma com carcinoma micro-invasivo do colo uterino e história de Doença de Whipple;
- uma com carcinoma invasor cervical;
- uma paciente com carcinoma invasivo de vagina.

A idade média das pacientes com lesões multicêntricas foi de 54,4 anos, com desvio padrão de 12,2 e do grupo onde não foi relatada a presença de outras patologias associadas no trato genital, 62,2 anos e desvio padrão de 22,1, diferença não significativa estatisticamente.

## 2.5. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS LESÕES

Os aspectos macroscópicos das lesões foram coletados à partir das descrições clínicas ou dos exames macroscópicos das peças cirúrgicas enviadas, relatadas em apenas sete casos e representadas por:

- um caso apresentando lesão discrômica ulcerada;
- cinco pacientes com lesões elevadas (três verrucosas, uma papulosa e uma ulcerada);
- uma contendo lesão plana irregular.

As medidas das lesões foram descritas em três casos, variando de 1,5 a 3,0 centímetros nos maiores eixos.

## 2.6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

O local de envolvimento vulvar foi relatado em oito casos, comprometendo apenas uma região em seis pacientes (75%) e em duas (25%), mais de um local e secundária à lesão extensa ou multifocal (Tabela 6).

**TABELA 6**

**Distribuição das lesões de carcinoma superficialmente invasivo na região vulvar**

| <b>Região vulvar envolvida</b>                          | <b>Número de casos (total = 8)</b> |
|---|------------------------------------|
| Grande lábio direito                                    | 1                                  |
| Pequeno lábio direito                                   | 1                                  |
| Fúrcula   | 1                                  |
| Períneo   | 3                                  |
| Pequeno e grande lábio direito                          | 1                                  |
| Pequenos e grandes lábios direito e esquerdo e clitóris | 1                                  |

## 2.7. FOCALIDADE DAS LESÕES

As lesões foram classificadas como unifocais ou multifocais, de acordo com os dados clínicos e/ou na presença de lesões múltiplas de neoplasia intraepitelial vulvar grau III associadas à lesão de carcinoma superficialmente invasivo, através da análise microscópica.

Devemos salientar que a presença de múltiplas lesões apresentando invasão estromal superficial, isto é, menor do que um milímetro, porém, separadas por epitélio adjacente não neoplásico, excluem o diagnóstico de carcinoma superficialmente invasivo, sendo caracterizadas como carcinoma escamoso invasivo vulvar. Entretanto, lesões únicas, com múltiplos focos de invasão estromal inicial, menores do que um milímetro, são classificadas como carcinoma superficialmente invasivo.

Assim, cinco (55,6%) eram lesões multifocais e quatro (44,4%), unifocais.

A idade média das pacientes com lesões multifocais foi de 48,6 anos, com desvio padrão de 12,2 e das unifocais, 69,5 anos e com desvio padrão de 14,5, diferença significativa do ponto de vista estatístico ( $p = 0,05$ ).

Das pacientes com lesões multifocais, quatro (80%) apresentavam outras lesões associadas no trato genital inferior e todas tinham lesão de NIV III de padrão bowenóide no epitélio adjacente à lesão invasora.

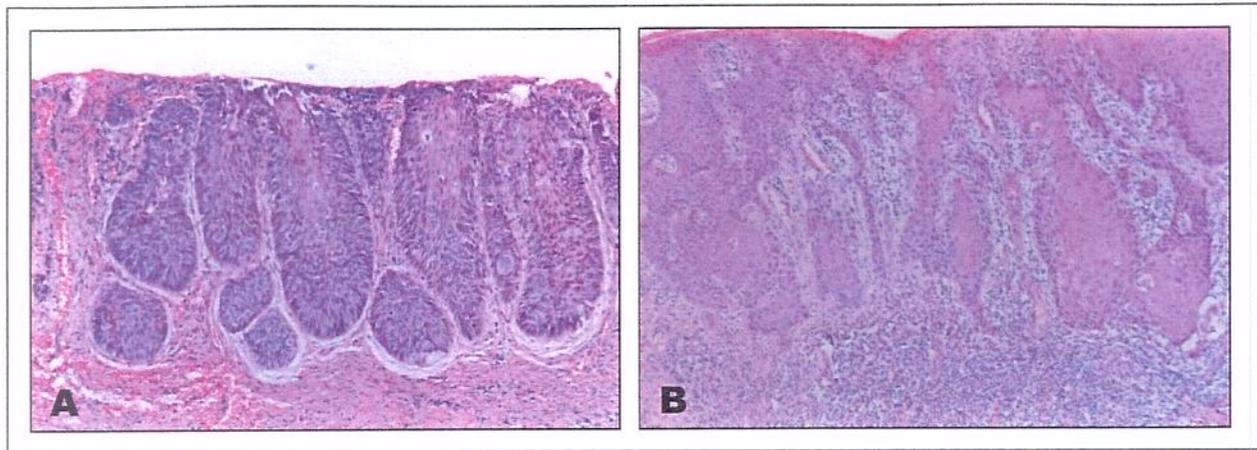
No grupo contendo lesões unifocais, somente uma (25%) tinha lesão multicêntrica, três (75%) apresentavam NIV III bowenóide e uma (25%), epitélio normal adjacente à área de invasão.

Não houve diferença estatística entre os dois grupos de pacientes para os parâmetros descritos acima.

## 2.8. PROFUNDIDADE DE INVASÃO

A profundidade de invasão variou de 0,1 a 0,9 milímetro (mm), sendo que cinco (55,6%) apresentavam profundidade de invasão menor ou igual a 0,5 mm.

O padrão de invasão estromal era do tipo compressivo em quatro casos (Figura 16-A) e do tipo infiltrativo em cinco (Figura 16-B).



**FIGURA 16 - Carcinoma superficialmente invasivo da vulva**

A) padrão compressivo de invasão estromal (B.2895/93, HE, 10x)

B) padrão infiltrativo de invasão estromal (B.54307/91, HE, 10x)

## 2.9. SINAIS HISTOLÓGICOS SUGESTIVOS DE INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Todos os casos do estudo apresentavam alterações coilocitóticas. Em sete, estavam localizadas apenas no epitélio de NIV III adjacente, um no epitélio de NIV III e com condiloma associado e em um outro caso estava presente na área de neoplasia invasora e não apresentava alterações histológicas no epitélio adjacente à invasão, isto é, NIV III, condiloma ou distrofia.

O grau de coilocitose variou de grau leve em cinco casos (55,6%), moderado em três (33,3%) e intenso em um caso (11,1%).

A intensidade das alterações coilocitóticas não estava relacionada com a idade média das pacientes ou com a presença de lesões multicêntricas. Entretanto, estava associada com a distribuição das lesões multifocais ou unifocais ( $p = 0,05$ ). Dos cinco casos com alterações coilocitóticas de grau leve, quatro (80%) eram unifocais e apenas uma multifocal. O grupo com coilocitose moderada ou intensa, apresentava lesões multifocais em todos os casos.

## **2.10. EXTENSÃO PARA OS ANEXOS CUTÂNEOS**

Apenas sete casos apresentavam anexos cutâneos no espécime contendo neoplasia para avaliação. Destes, cinco (71,4%) mostravam extensão: dois para folículos pilosos, dois para pêlos e glândulas sebáceas e um para glândulas mucosas.

## **2.11. ALTERAÇÕES EPITELIAIS ADJACENTES AO CARCINOMA SUPERFICIALMENTE INVASIVO**

Dos nove casos com diagnóstico de carcinoma superficialmente invasivo, oito (88,9%) apresentava neoplasia intraepitelial vulvar grau III padrão bowenóide adjacente à lesão invasiva. Destes, dois (22,2%) também tinham condiloma associado. Em uma paciente (11,1%), não foi observada nenhuma alteração no epitélio adjacente à neoplasia.

Não observamos diferença significativa entre as idades médias das pacientes apresentando ou não lesão de condiloma associado à neoplasia superficialmente invasiva.

## **2.12. METÁSTASES GANGLIONARES**

A linfadenectomia inguinal foi realizada em apenas cinco casos, não sendo observado metástases ganglionares em nenhum deles.

## **2.13. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Foi detectado o antígeno do capsídeo do papilomavírus humano em três casos (33,3%), no terço superior do epitélio, junto às áreas de paraceratose e coilocitose. Em todos os casos, a reação estava localizada no epitélio de NIV III adjacente a lesão invasiva, com leve grau de intensidade, distribuição focal e apresentando escassos núcleos corados.

Os três casos positivos apresentavam alterações coilocitóticas de grau variado (um de grau leve, um moderado e um intenso), apenas no epitélio de NIV III, sendo que um deles mostrava condiloma acuminado associado à lesão de NIV. Todas as pacientes tinham lesões multicêntricas e multifocais. Duas apresentavam o DNA viral e a proteína p53.

Em relação aos seis casos negativos (66,7%), observamos alterações coilocitóticas de grau leve em quatro e grau moderado em dois, no epitélio de NIV III, sendo que uma paciente deste último grupo também tinha condiloma associado. Também foi negativa a pesquisa do antígeno viral na paciente que não apresentava alteração epitelial adjacente à neoplasia invasiva. Duas apresentavam lesões multicêntricas e duas multifocais. A proteína p53 estava presente em quatro casos (66,7%) e em nenhum, o DNA viral.

A idade média das pacientes com exame positivo foi de 46 anos (desvio padrão de 5,6) e do grupo negativo, 63,8 anos (desvio padrão de 17,3), não significante estatisticamente.

Não houve relação entre os diferentes parâmetros analisados com a detecção do antígeno do capsídeo viral.

#### **2.14. DETECÇÃO DO DNA VIRAL ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU***

A reação de hibridização molecular *in situ* para o HPV foi positiva em apenas dois (22,2%) dos nove casos estudados. Em ambas a positividade estava localizada no terço superior do epitélio adjacente contendo neoplasia intraepitelial vulvar grau III bowenóide:

- uma paciente com hibridização molecular *in situ* positiva para o HPV tipo 16/18 em grau leve e para o tipo 31/35/51, em grau moderado. Tinha idade de 40 anos, lesões multifocais e apresentava outra lesão associada no trato genital inferior. Mostrava também alterações coilocitóticas em grau moderado, pesquisa do antígeno viral positiva e ausência da proteína p53;
- uma paciente com hibridização molecular *in situ* positiva em grau moderado para o HPV tipo 16/18 e idade de 51 anos. Apresentava lesão multicêntrica e multifocal. Tinha lesão de condiloma acuminado associado e pesquisa do antígeno viral e da proteína p53 positiva.

Quanto aos sete casos (77,8%) negativos, cinco mostrava alterações coilocitóticas em grau leve e dois moderados, sendo que um tinha condiloma plano adjacente associado. Neste grupo com resultado negativo, estava também a única paciente que não apresentava alteração no epitélio adjacente à neoplasia invasiva.

Três pacientes (42,9%) apresentavam lesões multicêntricas e três (42,9%) multifocais. Um caso foi positivo para a pesquisa do antígeno viral e cinco (71,4%) para a proteína p53.

A idade média das pacientes com reação positiva foi de 45,5 anos (desvio padrão de 7,8) e das com reação negativa, 61,4 anos (desvio padrão de 17), não significante através da análise estatística.

Nenhum dos parâmetros acima estava relacionado à detecção do DNA do papilomavírus humano.

## 2.15. RELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU* PARA A DETECÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

Dentre os nove casos, três (33,3%) foram positivos à pesquisa do antígeno ou DNA viral. Destes, dois foram concordantes, isto é, positivos para ambos os métodos (Tabela 7).

**TABELA 7**

**Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular *in situ* para a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma superficialmente invasivo**

|                                  | <u>Hibridização molecular <i>in situ</i></u> |                 | <i>Total</i> |
|----------------------------------|--|-----------------|--------------|
|                                  | Casos positivos                              | Casos negativos |              |
| <u><i>Imuno-histoquímica</i></u> |  |                 |              |
| Casos positivos                  | 2  | 1               | 3            |
| Casos negativos                  | 0  | 6               | 6            |
| <i>Total</i>                     | 2  | 7               | 9            |

*p* (Fisher)=0,08

Nas pacientes com um dos exames positivos, observamos que todas apresentavam lesões multicêntricas e multifocais e alterações coilocitóticas (uma em grau leve, uma com grau moderado e uma, intenso). Uma (33,3%) tinha lesão de condiloma associado e em duas (66,7%) detectou-se a proteína p53.

No grupo onde não foi demonstrado o vírus, observamos que duas pacientes apresentavam lesões multicêntricas e duas (33,3%) multifocais. Todas tinham alterações coilocitóticas (quatro de grau leve e duas com grau moderado). Uma apresentava condiloma e outra, epitélio normal adjacente à neoplasia invasiva. Quatro casos (66,7%) foram positivos para a proteína p53.

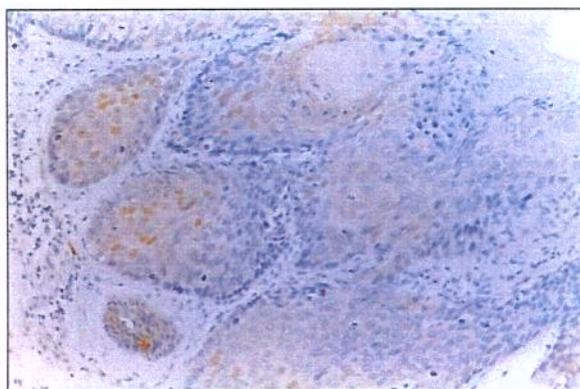
A idade média das pacientes com resultado positivo foi de 46 anos (desvio padrão de 5,6) e do grupo negativo, 63,8 anos (desvio padrão de 17,3).

Nenhum dos parâmetros analisados acima estava relacionado com a detecção do vírus.

## 2.16. DETECÇÃO DA PROTEÍNA P53 ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A reação foi positiva em seis casos (66,7%), localizada na metade inferior do epitélio de NIV III em dois, um na camada basal do epitélio de NIV III e na camada externa da área de invasão e em três casos, somente nas células mais externas da neoplasia invasiva (Figura 17).

A intensidade da reação foi de grau leve em quatro casos (66,7%) e moderado em dois (33,3%), com padrão de distribuição focal em quatro e difuso em dois.



**FIGURA 17 – Reação positiva para a proteína p53 em escassos blocos tumorais do carcinoma superficialmente invasivo (B. 11331/87, IHQ, 20x)**

Dentre os casos positivos, três apresentavam alterações coilocitóticas em grau leve, dois moderado e um intenso.

Em relação à pesquisa do antígeno do capsídeo viral, apenas dois casos foram positivos, ambos em grau leve e presente no epitélio de NIV III adjacente. Apenas um foi positivo para o HPV 16/18, em grau moderado, no epitélio de NIV III, pela técnica de hibridização molecular *in situ*. Este também foi positivo para a pesquisa do antígeno viral (Tabela 8).

Quatro pacientes (66,7%) apresentavam lesões multicêntricas e multifocais e uma tinha epitélio adjacente à neoplasia invasora sem alterações.

Analisando-se os três casos negativos para a proteína p53, observamos alterações coilocitóticas em grau leve em dois e em um, grau moderado, localizadas na lesão de NIV III adjacente. Dois foram negativos para a pesquisa do antígeno e DNA viral e um positivo para ambos os métodos de detecção do vírus (Tabela 8).

Uma paciente (33,3%) apresentava lesão multicêntrica e multifocal e duas (66,7%) tinham condiloma associado.

A idade média das pacientes com reação positiva foi de 59,5 anos (desvio padrão de 18,2) e do grupo negativo, 54,7 anos (desvio padrão de 15,6), não significante do ponto de vista estatístico, assim como os outros parâmetros analisados.

**TABELA 8**

**Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma superficialmente invasivo**

|              | p53 negativo | p53 positivo | Total |
|--------------|--------------|--------------|-------|
| HPV negativo | 2            | 4            | 6     |
| HPV positivo | 1            | 2            | 3     |
| <b>Total</b> | 3            | 6            | 9     |

*p* (Fisher) =1,0

HPV: papilomavirus humanos

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO VULVAR (Anexo I)

No período compreendido entre 1983 e 1995, identificamos 129 pacientes com diagnóstico de carcinoma escamoso invasivo da vulva (Figura 18). Devido ao grande número de casos, selecionamos para este estudo os referentes aos últimos cinco anos, entre 1991 e 1995, considerados como mais recentes e, portanto, presumidamente melhor preservados. Neste período foram diagnosticados 67 casos de carcinoma escamoso invasivo vulvar. Entretanto, muitos estavam representados apenas pela biópsia diagnóstica e para uma melhor amostragem, optamos por incluir apenas os espécimes provenientes de vulvectomias correspondentes a 55 pacientes (Figura 18).

Algumas pacientes deste período apresentavam outros exames anatomopatológicos em anos anteriores, sendo que a figura abaixo (Figura 18) mostra o número total de casos por ano, correspondentes à data do primeiro exame diagnóstico. Podemos observar que 62 casos (48,1%) ocorreram na década de 80 e 67 (51,9%) na década de 90.

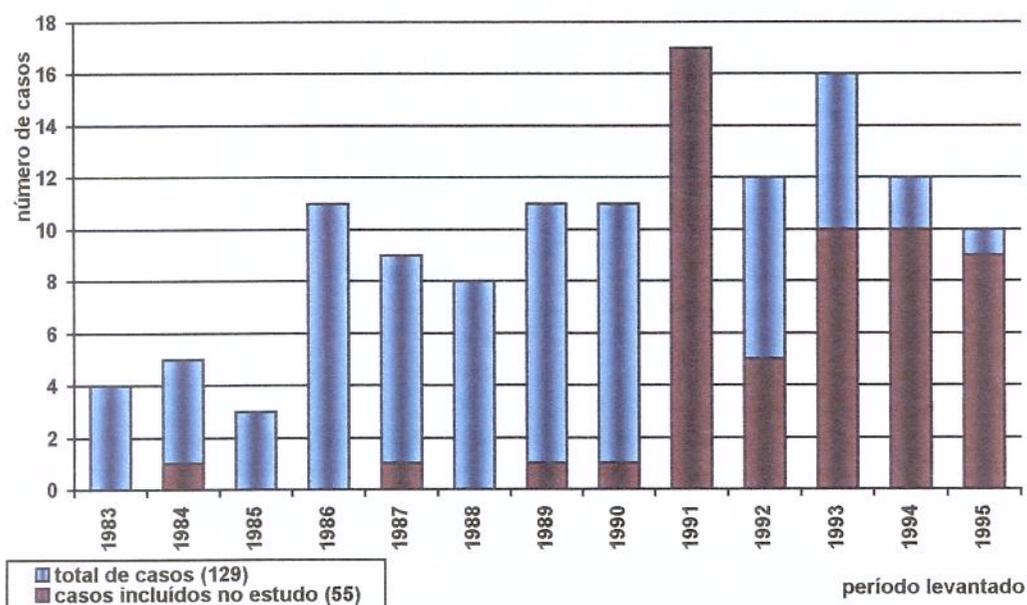


FIGURA 18 - Distribuição dos casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva, levantados entre 1983 e 1995

Também neste grupo, como já previamente relatado para as pacientes com diagnóstico de NIV III e carcinoma superficialmente invasivo, analisamos a idade das pacientes, etnia e a presença de outras patologias associadas no trato genital feminino inferior. Também avaliamos a localização, focalidade e o aspecto macroscópico das lesões. Através do exame histológico, identificamos a presença de sinais sugestivos de infecção viral, a variante histológica, a profundidade de invasão estromal, a presença de metástases ganglionares e as alterações do epitélio adjacente à neoplasia invasora.

As técnicas especiais de imuno-histoquímica e hibridização molecular *in situ* foram realizadas para a identificação do papilomavírus humanos e da proteína p53.

### 3.1. DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA

A idade das pacientes variou de 34 a 89 anos, com idade média de 67,8 anos e desvio padrão de 12,5.

Apenas duas (3,6%) apresentavam idade inferior a 40 anos, e 76,4% mais de 60 anos, com pico de incidência entre a sétima e oitava década de vida (Figura 19).

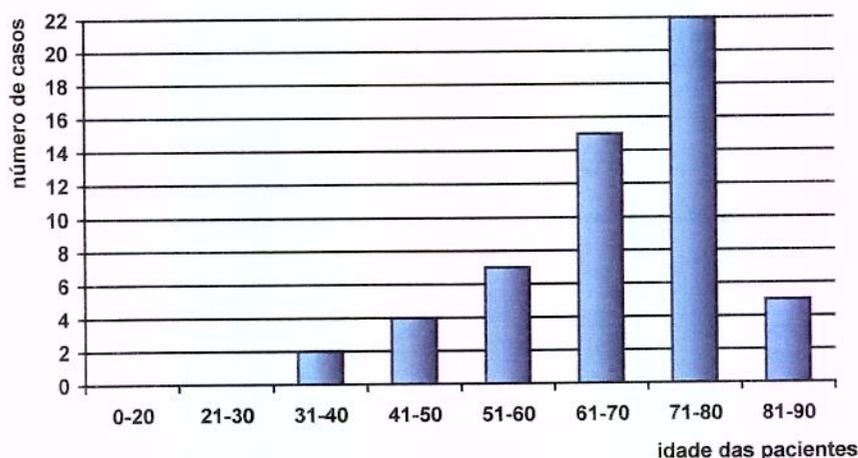


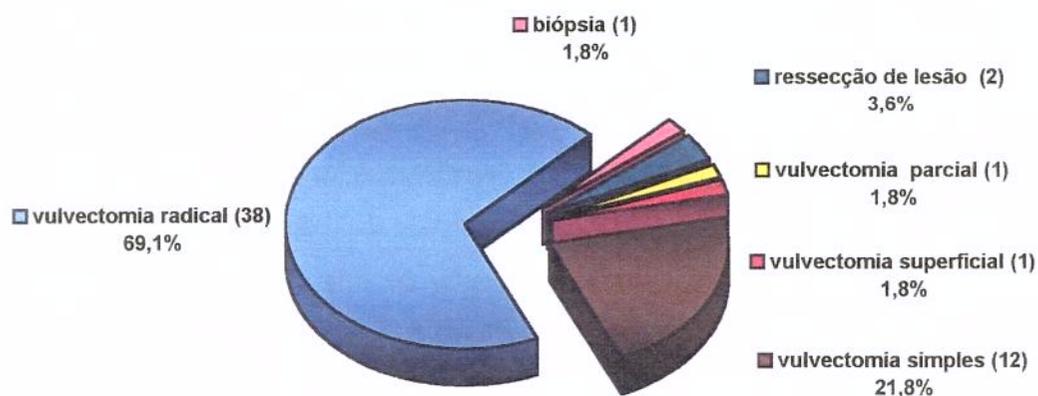
FIGURA 19 – Idade das pacientes com carcinoma escamoso invasivo vulvar

### 3.2. ETNIA

A etnia foi relatada em todos os casos, sendo que 51 pacientes (92,7%) eram caucasóides e quatro (7,3%), afro-brasileiras ou descendentes.

### 3.3. TIPO DE CIRURGIA REALIZADA

Dezessete pacientes apresentavam apenas um exame anatomopatológico e 38 mais de um, representados na sua maioria (29 casos) por biópsia diagnóstica seguida de ampliação cirúrgica e em nove, secundário à neoplasia recidivante. Consideramos o tratamento mais radical realizado, com exceção de dois casos, onde um foi considerado como vulvectomy superficial, no qual a vulvectomy radical havia sido realizada há seis anos e no outro caso, como biópsia, com vulvectomy radical prévia há cinco anos e com diagnóstico histológico primário apenas de NIV III bowenóide (Figura 20).



**FIGURA 20 - Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva**

Em nove casos de vulvectomy simples e na vulvectomy superficial, não foi realizada a linfadenectomia. Entretanto, em todos os casos de vulvectomy parcial, ressecção de lesão e vulvectomy radical, os linfonodos foram ressecados bilateralmente.

### 3.4. HISTÓRIA DE OUTRAS LESÕES ASSOCIADAS NO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

Estava relatada na requisição de exame anatomopatológico a presença de outras doenças associadas no trato genital inferior em apenas quatro pacientes (7,3%). Destas, duas apresentavam carcinoma invasivo da cérvix uterina e duas, neoplasia intraepitelial vaginal grau II e III, respectivamente. As outras pacientes ou não apresentavam outras lesões associadas, ou apenas não foram relatadas pelo clínico na requisição de exame.

A idade média das pacientes apresentando lesões multicêntricas foi de 53,5 anos, desvio padrão de 16,9 e a do grupo onde não havia relato de outra lesão associada, 68,9 anos, com desvio padrão de 11,5, diferença significativa do ponto de vista estatístico ( $p = 0,02$ ).

Nas quatro pacientes contendo outras lesões associadas, observamos que três (75%) tinham lesões multifocais, duas eram da variante histológica basalóide e duas do tipo usual queratinizante. Duas pacientes apresentavam alterações coilocitóticas de grau moderado. Quanto às alterações no epitélio adjacente à neoplasia invasora, duas tinham hiperplasia escamosa e duas NIV III padrão bowenóide.

Em relação às técnicas especiais, verificamos que três (75%) apresentaram reação positiva para a presença do HPV, todas através da reação de imuno-histoquímica, sendo que uma também pela hibridização molecular *in situ*. Em apenas um caso (25%) detectou-se a proteína p53.

Comparando-se estes diferentes parâmetros com as pacientes onde não foram relatadas lesões multicêntricas, observamos significância estatística em relação a focalidade das lesões ( $p=0,04$ ), ao resultado da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do antígeno do capsídeo viral ( $p=0,0001$ ) e à presença do vírus detectada por um ou outro método ( $p=0,001$ ).

Assim, para estas variáveis significantes, observamos no grupo onde não havia relato de outras lesões associadas no trato genital as seguintes características: dez lesões multifocais (19,6%) e presença do vírus em apenas um caso (2%), detectado apenas através da técnica de hibridização molecular *in situ*.

### **3.5. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS LESÕES**

Os aspectos macroscópicos das lesões puderam ser avaliados em todos os casos, a partir das descrições clínicas ou macroscópicas das peças cirúrgicas.

As lesões eram predominantemente elevadas (51 casos) e descritas como pápulas, nódulos ou exofíticas. Destas, somente três foram descritas como acastanhadas e o restante, esbranquiçadas e 25 como ulceradas.

Duas lesões foram relatadas como apresentando apenas alteração discrômica e duas como ulceração rasa.

O tamanho do tumor foi descrito em apenas 46 casos, variando de 0,2 a 7,0 centímetros de extensão, com média de 3,9 cm no maior eixo.

### **3.6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES**

Somente 23 lesões (41,8%) estavam restritas a apenas um local da vulva, sendo que as 32 restantes (58,2%) comprometiam mais de uma região, secundárias a lesões extensas ou multifocais.

Dentre os 55 casos do estudo, 18 lesões (32,7%) eram bilaterais, 30 (54,5%) unilaterais, sendo 17 à direita e 13 à esquerda e sete casos (12,7%) eram de localização central.

Em 23 (41,8%) havia envolvimento da região clitoriana, sendo que em cinco, a neoplasia encontrava-se restrita a este local.

Como a maioria das lesões acometia mais de uma região da vulva, somamos todos os locais referidos isoladamente, para verificar se havia maior predileção para determinada localização topográfica e identificamos a seguinte distribuição (Tabela 9):

**TABELA 9****Distribuição das lesões de carcinoma invasivo, somando-se todas as regiões da vulva envolvidas isoladamente**

| <b>Regiões vulvares envolvidas</b> | <b>Número de lesões (total = 124)</b> |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Grandes lábios                     | 36 (29%)                              |
| Pequenos lábios                    | 58 (46,8%)                            |
| Clitoris                           | 23 (18,5%)                            |
| Períneo                            | 3 (2,4%)                              |
| Região inguinal                    | 2 (1,6%)                              |
| Uretra                             | 1 (0,8%)                              |
| Vagina                             | 1 (0,8%)                              |

### 3.7. FOCALIDADE DAS LESÕES

As lesões foram classificadas como multifocais ou unifocais a partir dos dados clínicos e/ou das descrições macroscópicas. As multifocais foram definidas como aquelas apresentando mais de uma lesão de carcinoma escamoso invasivo, separadas por epitélio não neoplásico, sem evidências histológicas de continuidade entre as lesões invasivas.

Dentre os 55 casos, 13 (23,6%) eram multifocais e 42 (76,4%) unifocais, embora muitas lesões fossem extensas.

Analisando-se os treze casos com lesões multifocais observamos as seguintes características: idade média de 62,9 anos (desvio padrão de 14,4), três (23,1%) com lesões multicêntricas, seis (46,2%) contendo alterações coilocitóticas e cinco (38,5%) com metástases ganglionares. Três (23,1%) eram de padrão histológico basalóide, nove (69,2%) queratinizante e um (7,7%) condilomatoso.

O epitélio adjacente apresentava distrofia mista em três casos (23,1%), hiperplasia escamosa em quatro (30,8%), neoplasia intraepitelial vulvar grau II em um caso (7,7%) e grau III em cinco (38,5%) (dois bowenóides e três basalóides).

Em relação aos resultados das técnicas especiais, detectamos o antígeno do capsídeo viral em dois casos (15,4%) e em oito (61,5%) a proteína p53. Em nenhum caso detectou-se o DNA do HPV.

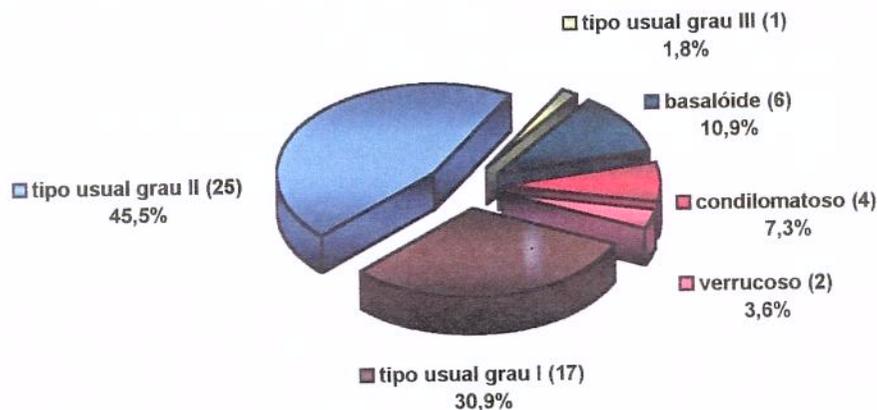
As pacientes com lesões unifocais apresentavam idade média de 69,3 anos, com desvio padrão de 11,6. Apenas uma (2,4%) apresentava lesão multicêntrica, 24 (57,1%) tinham alterações coilocitóticas e 20 (47,6%) mostravam metástases ganglionares.

Três (7,1%) eram de padrão histológico basalóide, 34 (81%) do tipo usual, três (7,1%) condilomatosos e dois (4,8%) verrucosos. No epitélio adjacente à neoplasia invasora identificamos em 14 (33,3%) lesões de líquen escleroso, hiperplasia escamosa em dez (23,8%), NIV II em dois (4,8%), NIV III em nove (21,4%) (quatro da variante bowenóide e cinco basalóides), uma (2,4%) contendo doença de Paget e seis (14,3%) sem alterações.

Nenhum dos parâmetros estava associado a focalidade das lesões, exceto pela relação entre a presença de lesões multicêntricas com lesões multifocais ( $p = 0,04$ ).

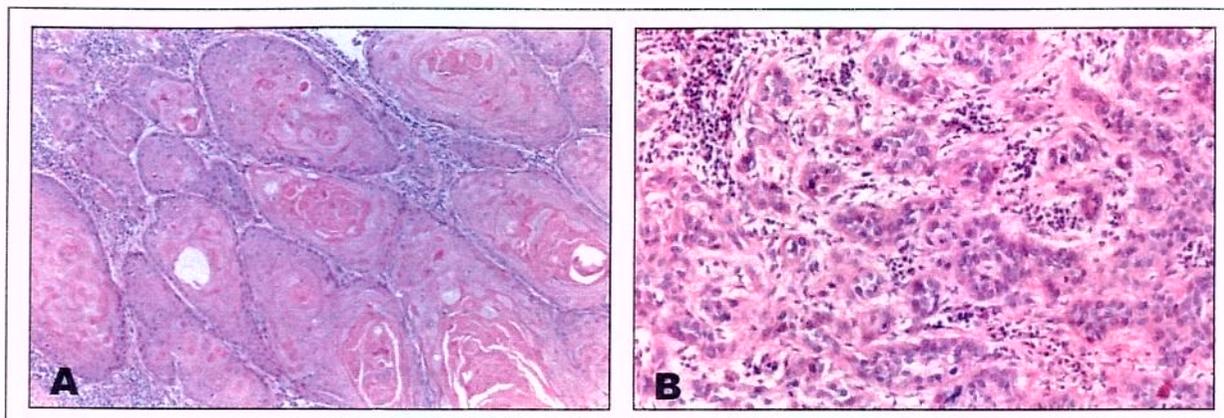
### 3.8. VARIANTES HISTOLÓGICAS

As variantes histológicas do carcinoma escamoso invasivo vulvar estavam assim representadas (Figuras 21-25):



**FIGURA 21 - Variantes histológicas do carcinoma escamoso invasivo da vulva**

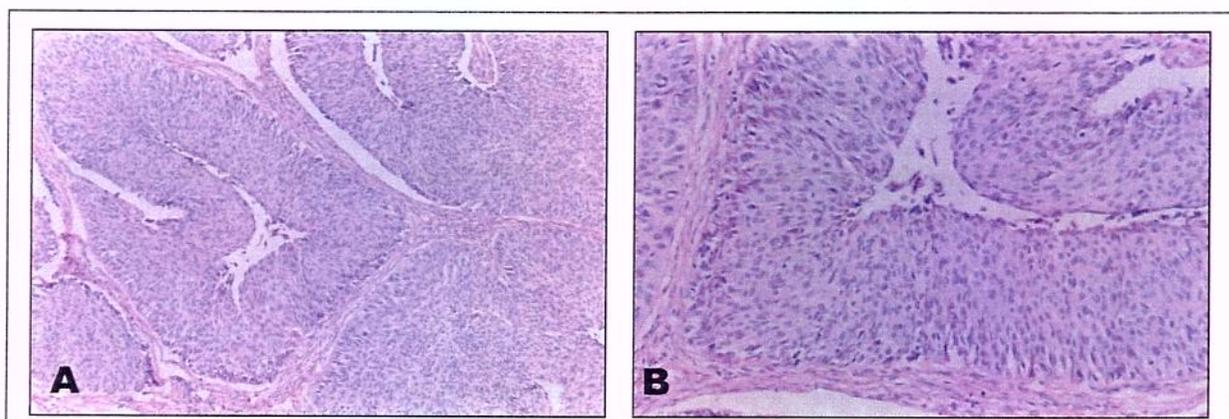
Algumas pacientes apresentavam mais de um exame anatomopatológico. Quando as variantes histológicas foram discordantes, para o diagnóstico final foi considerado a lesão com o grau histológico maior ou o espécime proveniente de ressecção mais ampla e, portanto, contendo uma maior amostragem da neoplasia para avaliação.



**FIGURA 22 – Carcinoma escamoso invasivo, padrão queratinizante**

A) Bem diferenciado, grau I (B.12103/93, HE, 10x)

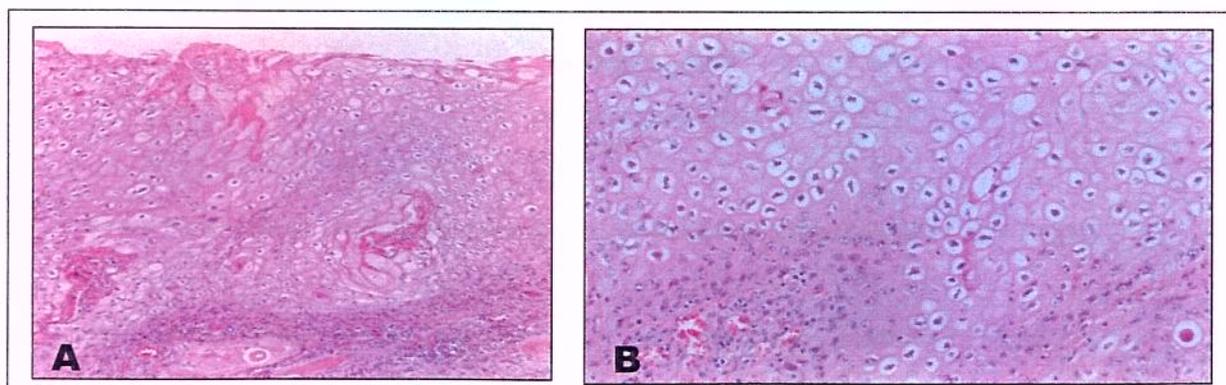
B) Pouco diferenciado, grau III (B.11443/93, HE, 20x)



**FIGURA 23 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão basalóide (B.58793/91, HE)**

A) Aumento: 10x

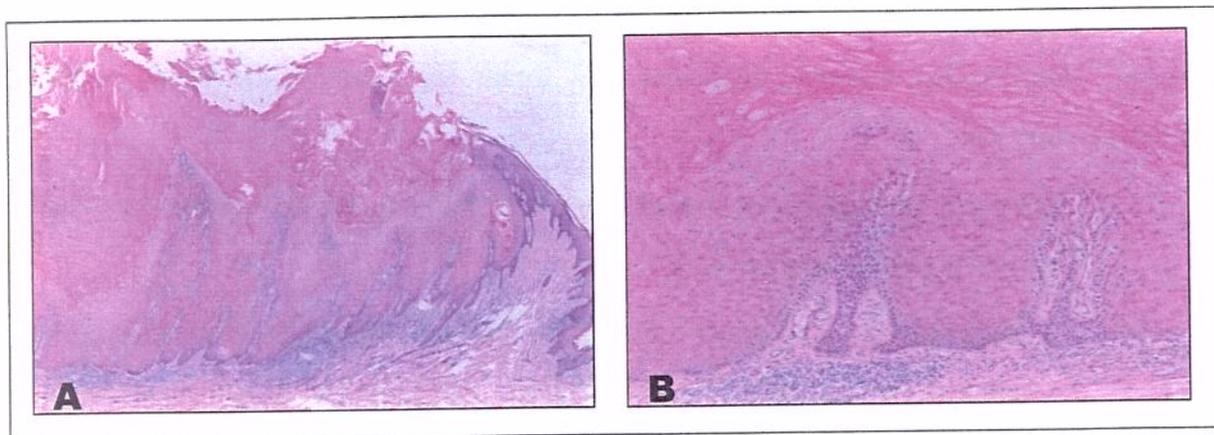
B) Pormenor, aumento: 20x



**FIGURA 24 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão condilomatoso (B.2840/93, HE)**

A) Aumento: 10x

B) Pormenor, aumento: 20x



**FIGURA 25 - Carcinoma escamoso invasivo, padrão verrucoso (B.2997/94, HE)**  
**A)** Aumento: 2,5x      **B)** Pormenor, aumento: 10x

O carcinoma queratinizante foi o padrão histológico predominante, presente em 43 casos (78,2%), sendo 39,5% bem diferenciados (grau I), 58,1% moderadamente diferenciados (grau II) e somente um caso (2,3%) pouco diferenciado (grau III).

A tabela 10 mostra um resumo dos principais achados em cada um dos subtipos histológicos do carcinoma escamoso invasivo vulvar.

**TABELA 10**

**Principais achados relacionados aos subtipos histológicos do carcinoma invasivo vulvar**

|                         | <i>Subtipos histológicos</i> |                    |                        |                    |
|-------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|                         | Queratinizante<br>(n=43)     | Basalóide<br>(n=6) | Condilomatoso<br>(n=4) | Verrucoso<br>(n=2) |
| Idade média             | 68,9 anos                    | 56,8 anos          | 66 anos                | 79 anos            |
| Lesões no TGF           | 2 (4,6%)                     | 2 (33,3%)          | 0                      | 0                  |
| Lesões multifocais      | 9 (20,9%)                    | 3 (50%)            | 1 (25%)                | 0                  |
| Coilocitose             | 21 (48,8%)                   | 4 (66,7%)          | 4 (100%)               | 1 (50%)            |
| Metástases ganglionares | 18 (41,9%)                   | 4 (66,7%)          | 3 (75%)                | 0                  |
| Epitélio adjacente      |                              |                    |                        |                    |
| - normal                | 5 (11,6%)                    | 0                  | 0                      | 1 (50%)            |
| - hiperplasia escamosa  | 12 (27,9%)                   | 1 (16,7%)          | 2 (50%)                | 0                  |
| - líquen ou DM          | 14 (32,6%)                   | 0                  | 2 (50%)                | 1 (50%)            |
| - NIV III               | 9 (20,9%)                    | 5 (83,3%)          | 0                      | 0                  |
| Presença do HPV         | 1 (2,3%)                     | 3 (50%)            | 0                      | 0                  |
| Proteína p53            | 26 (60,5%)                   | 2 (33,3%)          | 4 (100%)               | 0                  |

n: número de casos

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

TGF: lesão associada no trato genital inferior

HPV: papilomavírus humanos

DM: distrofia mista

Comparando-se os diferentes padrões histológicos do carcinoma escamoso invasivo, identificamos algumas diferenças que foram significantes através da análise estatística, entre elas:

- diferença entre as idades médias das pacientes contendo as variantes basalóide e usual queratinizante ( $p=0,02$ );
- a distribuição das lesões distróficas (líquen escleroso e/ou hiperplasia escamosa) e de NIV III no epitélio adjacente à neoplasia invasora, comparando-se os padrões basalóide e condilomatoso ( $p=0,05$ ) e também os padrões basalóide e usual ( $p=0,01$ );
- a presença ou ausência de alterações coilocitóticas não estava associada ao padrão histológico. Entretanto, o grau de coilocitose estava relacionado ao tipo histológico da neoplasia quando comparamos os grupos basalóide e usual contendo alterações coilocitóticas de grau leve, com as de intensidade moderada/intensa ( $p=0,003$ ). Também foi significante quando agrupamos o padrão usual com o verrucoso e o condilomatoso com o basalóide e comparamos com a presença ou ausência de alterações coilocitóticas ( $p=0,04$ ) e com o grau de coilocitose ( $p=0,0005$ );
- o HPV (antígeno e/ou DNA viral) foi detectado em quatro casos de carcinoma escamoso invasivo vulvar, através de um dos dois métodos utilizados, sendo que em três (75%) a neoplasia era da variante histológica basalóide e em um, do tipo usual queratinizante ( $p=0,02$ ).

### 3.9. PROFUNDIDADE DE INVASÃO

Avaliando-se a profundidade de invasão nos 55 casos deste grupo, ela variou de 1,5 a 15,0 milímetros, com média de 6,7 mm, sendo que 45,4% das lesões apresentavam invasão estromal menor ou igual a cinco milímetros e estavam assim distribuídas:

- 1,1 a 3,0 mm = 12 casos (21,8%);
- 3,1 a 5,0 mm = 13 casos (23,6%);
- 5,1 a 10,0 mm = 21 casos (38,2%);
- 10,1 a 15,0 mm = nove casos (16,4%).

### 3.10. SINAIS HISTOLÓGICOS SUGESTIVOS DE INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

Em relação às alterações coilocitóticas, elas estavam presentes em 30 casos (54,5%), sendo de grau leve em 21 (70%), moderado em oito (26,7%) e intenso em um (3,3%). Na tabela abaixo, correlacionamos o grau das alterações coilocitóticas e a sua localização no epitélio (Tabela 11).

**TABELA 11**  
**Intensidade e localização das alterações histológicas sugestivas de infecção viral no carcinoma invasivo**

| <i>Localização</i>                  | <i>Intensidade das alterações coilocitóticas</i> |                 |                | <i>Total</i> |
|-------------------------------------|--|-----------------|----------------|--------------|
|                                     | <i>leve</i>                                      | <i>moderado</i> | <i>intenso</i> |              |
| Células tumorais                    | 8  | 1               | 0              | 9            |
| Epitélio normal                     | 2  | 0               | 0              | 2            |
| NIV (I, II, III)                    | 3  | 1               | 1              | 5            |
| Epitélio normal e NIV (I, II, III)  | 1  | 3               | 0              | 4            |
| Células tumorais e NIV (I, II, III) | 4  | 2               | 0              | 6            |
| Células tumorais e epitélio normal  | 3  | 1               | 0              | 4            |
| <b>Total</b>                        | <b>21</b>  | <b>8</b>        | <b>1</b>       | <b>30</b>    |

NIV I, II, III = neoplasia intraepitelial grau I, II e III, respectivamente.

Duas pacientes (6,7%) apresentavam lesões multicêntricas e seis (20%) multifocais. Quatro (13,3%) eram da variante basalóide, quatro (13,3%) condilomatosos, 21 (70%) usuais e um (3,3%) de padrão verrucoso.

Quanto às alterações do epitélio adjacente à neoplasia invasiva, observamos que 14 (46,7%) apresentavam lesões distróficas, duas (6,7%) epitélio normal, três (10%) NIV II e 11 (36,7%) NIV III (cinco da variante bowenóide e seis basalóides), sendo que neste último grupo, três tinham condiloma e quatro, alterações distróficas associadas.

Em relação às técnicas especiais, elas foram positivas para a detecção do antígeno e do DNA viral respectivamente em dois casos cada, sendo que o HPV foi identificado no total de três casos (10%) por um ou outro método utilizado. A proteína p53 estava presente em 22 casos (73,3%).

Os casos desprovidos de atipias coilocitóticas mostravam lesões multicêntricas em dois casos (8%) e multifocais em sete (28%). Dois (8%) eram da variante basalóide, 22 (88%) de padrão usual e um (4%) do tipo verrucoso. Alterações distróficas estavam presentes em 17 casos (68%), cinco (20%) tinham epitélio normal adjacente e três (12%) NIV III (uma da variante bowenóide e duas basalóides), sendo que duas destas pacientes apresentavam lesões distróficas associadas.

O HPV estava presente em apenas um caso (4%), detectado através da imunohistoquímica. Em dez (40%) identificou-se a proteína p53.

A idade média das pacientes apresentando coilocitose foi de 64,8 anos e desvio padrão de 13,8 e do grupo desprovido de alterações coilocitóticas, 71,3 anos, com desvio padrão de 9,8, diferença significativa do ponto de vista estatístico ( $p=0,05$ ), embora não tivesse correlação com a intensidade das atipias coilocitóticas.

Quando comparamos os parâmetros analisados acima entre os dois grupos de pacientes, não observamos relação entre a presença de coilocitose com lesões multicêntricas ou multifocais, bem como com a detecção do vírus e da proteína p53. Entretanto, a intensidade das alterações coilocitóticas estava associada com a presença do papilomavírus humanos ( $p=0,02$ ).

Também foi significativa quando comparamos os grupos de pacientes desprovidas de coilocitose ou com grau leve, com o grupo apresentando alterações coilocitóticas de grau moderado ou intenso e correlacionamos com a presença de lesões distróficas e de NIV III adjacentes à neoplasia ( $p<0,0001$ ).

Não houve relação entre a presença de coilocitose com os tipos histológicos e com o grau de diferenciação da neoplasia invasora. Entretanto, observamos diferença significativa entre a intensidade das alterações coilocitóticas presentes nos grupos contendo a variante basalóide e o tipo usual ( $p=0,003$ ).

### 3. 11. ALTERAÇÕES EPITELIAIS ADJACENTES AO CARCINOMA INVASIVO

As alterações observadas no epitélio adjacente à neoplasia invasora foram divididas em três grandes grupos, embora algumas pacientes apresentassem mais de uma lesão associada.

#### 3.11.1. Lesões distróficas (33 casos)

Hiperplasia escamosa estava presente em 16 casos (48,5%), distrofia mista em 12 (36,4%) e líquen escleroso em cinco (15,1%) (Figura 26).

A idade média das pacientes era de 68,9 anos, com desvio padrão de 10,1, sendo que uma (3%) tinha idade inferior a 40 anos, cinco (15,2%) entre 41 e 60 anos e 27 (81,8%) mais de 60. Todas as pacientes contendo líquen escleroso e distrofia mista tinham mais de 60 anos de idade.

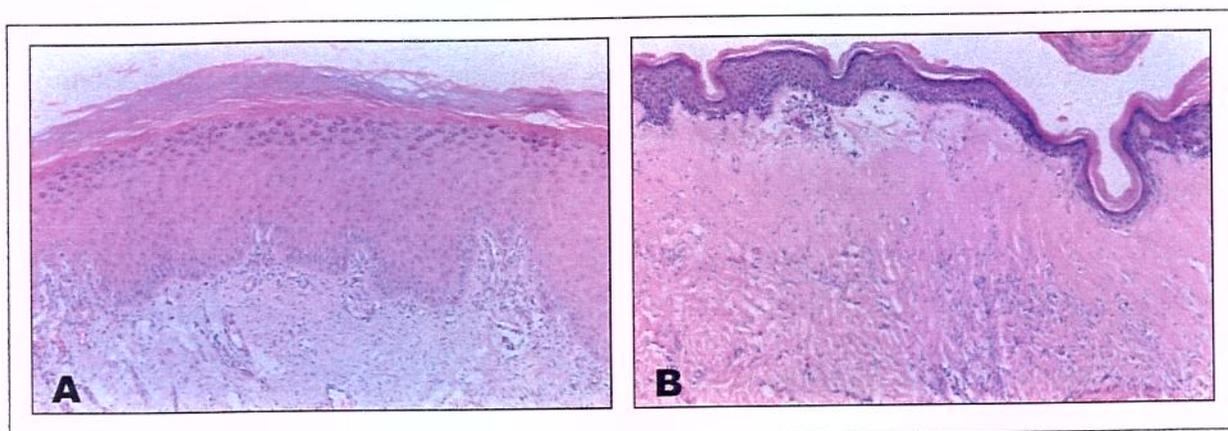
Apenas duas (6,1%), ambas contendo hiperplasia escamosa, apresentavam lesões multicêntricas e oito (24,2%) multifocais.

Os tipos histológicos da neoplasia estavam representados por: padrão basalóide em um caso (3%), quatro condilomatosos (12,1%), 27 (81,8%) usuais e um (3%) verrucoso.

Em 16 casos (48,5%) havia coilocitose, sendo a maioria (87,5%) de intensidade leve.

Associadas às lesões distróficas, identificamos área adjacente de carcinoma superficialmente invasivo em dois casos (6,1%), condiloma na uretra em um e neoplasia intraepitelial vulvar grau I em sete casos (21,2%) e grau II em dois (6,1%).

Em uma paciente (3%) contendo hiperplasia escamosa, foi detectado o antígeno do capsídeo viral. Em nenhuma identificamos o DNA do HPV. A proteína p53 estava presente em 21 casos (63,6%).

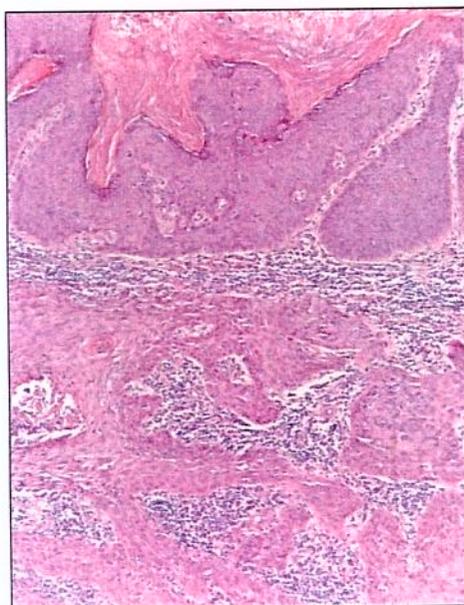


**FIGURA 26 – Lesões distróficas associadas ao carcinoma invasivo**

- A) Hiperplasia escamosa (B. 2895/93, HE, 10x)
- B) Líquen escleroso (B. 5535/84, HE, 10x)

### **3.11.2. Neoplasia intraepitelial vulvar grau III (14 casos)**

Em seis casos (42,9%) a neoplasia intraepitelial vulvar grau III era da variante histológica bowenóide (Figura 27) e em oito (57,1%), de padrão basalóide.



**FIGURA 27 - Carcinoma escamoso invasivo queratinizante associado a NIV III bowenóide (B.62492/91, HE, 10x)**

A idade média das pacientes era de 62,1 anos, com desvio padrão de 13,5. O grupo contendo a variante bowenóide tinha idade média de 54,8 anos e desvio padrão de 15,4 e o de padrão basalóide, 67,6 anos e desvio padrão de 9,3. Embora não houvesse diferença estatística entre as idades médias destes dois grupos, observamos significância quanto à distribuição do número de pacientes com idade inferior e superior a 50 anos ( $p=0,05$ ). No grupo etário com menos de 50 anos, três lesões de NIV III eram da variante bowenóide e nenhuma de padrão basalóide; no grupo com mais de 50 anos, três eram bowenóides e oito basalóides.

Duas pacientes (14,3%), ambas contendo NIV III de padrão bowenóide, apresentavam lesões multicêntricas e cinco (35,7%) multifocais, sendo três da variante basalóide e duas bowenóides.

Alterações coilocitóticas estavam presentes em 11 casos (78,6%), sendo de intensidade leve em quatro (36,4%) e moderado ou intenso em sete (63,6%).

Associados à neoplasia intraepitelial vulvar grau III adjacente, observamos que três pacientes apresentavam condiloma (todas da variante bowenóide), três hiperplasia escamosa (duas basalóides e uma bowenóide) e três, distrofia mista ou líquen escleroso (todas da variante basalóide).

O tipo histológico da neoplasia invasora estava representado por: cinco (35,7%) de padrão basalóide e nove (64,3%) do tipo queratinizante.

A profundidade de invasão estromal também foi significativa ( $p=0,03$ ) na sua distribuição quando comparadas as pacientes contendo NIV III de padrão basalóide e bowenóide. Considerando a profundidade de invasão menor ou igual a cinco milímetros, cinco eram da variante bowenóide e um, basalóide; no grupo com invasão maior do que cinco milímetros, uma era de padrão bowenóide e sete basalóides.

Reação positiva para o antígeno do capsídeo viral estava presente em dois casos (14,3%), ambos contendo NIV III de padrão bowenóide, desprovidos de distrofia, sendo que um apresentava lesão de condiloma associado. O DNA viral foi identificado em dois casos (14,3%), ambos bowenóides, desprovidos de distrofia, e com condiloma adjacente associado. A detecção do HPV por um ou outro método ocorreu em três casos (21,4%).

A proteína p53 estava presente em oito casos (57,1%), sendo quatro da variante basalóide e quatro bowenóides. Quatro mostravam alterações distróficas associadas e um, lesão de condiloma.

### **3.11.3. Epitélio normal, líquen simples crônico e doença de Paget (oito casos)**

Quatro casos não mostravam outras alterações além da neoplasia invasora. Três estavam representados por líquen simples crônico, sendo que um tinha também NIV II focal associado. Uma paciente apresentava doença de Paget vulvar multifocal.

A idade média das pacientes foi de 77,4 anos, com desvio padrão de 8,4.

Os padrões histológicos da neoplasia invasora estavam representados por: sete (87,5%) do tipo usual queratinizante e um caso (12,5%) verrucoso.

Nenhuma apresentava lesões multicêntricas ou multifocais. Três (37,5%) apresentavam alterações coilocitóticas, todas de intensidade leve.

Em nenhum caso detectou-se o papilomavírus humano e a proteína p53 foi identificada em três (37,5%).

Comparando-se os tipos de alterações epiteliais adjacentes à neoplasia invasora (Tabela12) com os diferentes parâmetros analisados, não observamos correlação com: a presença de lesões multicêntricas ou multifocais e de metástases ganglionares, a profundidade de invasão e o resultado da técnica de detecção da proteína p53. Entretanto, pudemos observar algumas particularidades significantes do ponto de vista estatístico:

- diferença entre a idade média de 62,1 anos das pacientes apresentando NIV III e a do grupo contendo lesões distróficas, 68,9 anos, mostrou tendência estatística ( $p=0,07$ );
- a distribuição do número de pacientes com NIV III e com lesões distróficas, nos grupos etários: menor de 40 anos, entre 41 e 60 e maiores de 60 anos ( $p=0,004$ );

- foi significativa a diferença entre a idade média das pacientes apresentando condiloma (48,2 anos) e a do grupo desprovido desta lesão (69,3 anos) ( $p=0,0007$ );
- tendência estatística ( $p=0,09$ ), quando comparamos as pacientes com epitélio adjacente normal, com NIV III e distrofia, entre o grupo contendo os tipos histológicos basalóide e condilomatoso, em relação ao grupo com os padrões usual e verrucoso. Também significativa foi a distribuição das lesões de NIV III e distróficas, quando comparamos os tipos histológicos basalóide e usual ( $p=0,01$ );
- a presença ou ausência de alterações coilocitóticas foi significativa ( $p=0,03$ ) entre os grupos de pacientes apresentando distrofia e NIV III, assim como a intensidade da coilocitose nas lesões ( $p=0,007$ ). Quando agrupamos as pacientes desprovidas de coilocitose ou com grau leve e as com grau moderado ou intenso, e comparamos os grupos contendo epitélio normal, distrófico e de NIV III, também observamos diferença estatística significativa ( $p=0,0004$ );
- a detecção do antígeno ou DNA viral mostrou-se significativa ( $p=0,04$ ) quando comparamos os grupos contendo epitélio normal, com alterações distróficas e com NIV III adjacente.

**TABELA 12**

**Comparação de proporções e das idades médias das pacientes contendo lesões distróficas e NIV III no epitélio adjacente ao carcinoma invasivo**

|                         | NIV III (n=14) | Distrofia (n=33) | Valor de p  |
|-------------------------|----------------|------------------|-------------|
| Idade média (anos)      | 62,1           | 68,9             | 0,07        |
| Multifocalidade         | 35,7%          | 24,2%            | 0,4         |
| Condiloma               | 21,4%          | 3%               | <b>0,04</b> |
| Invasão < 5mm           | 42,9%          | 51,5%            | 0,6         |
| Metástases ganglionares | 35,7%          | 45,5%            | 0,5         |
| HIS positivo            | 14,3%          | 0%               | <b>0,04</b> |
| HPV positivo            | 21,4%          | 3%               | <b>0,04</b> |
| p53 positivo            | 57,1%          | 63,6%            | 0,7         |

n – número total de casos

NIV III – neoplasia intraepitelial vulvar grau III

HIS – hibridização molecular *in situ*

HPV positivo – detecção do papilomavírus humanos através de uma ou outra técnica

### 3.12. METÁSTASES GANGLIONARES

A linfadenectomia foi realizada em 44 casos, tendo sido observado metástases ganglionares em 25 (56,8%). Destas, 15 (60%) eram bilaterais e dez (40%) unilaterais.

A idade média das pacientes com metástases ganglionares foi 67,8 anos e desvio padrão 13 e do grupo desprovido de metástases, 66,9 anos e desvio padrão de 10,7.

Em relação à topografia da neoplasia invasora, notamos que nos dez casos com metástases unilaterais: em cinco as lesões estavam localizadas no mesmo lado dos linfonodos envolvidos, duas eram bilaterais e três centrais (duas em clitoris e uma em períneo). Dentre as pacientes com metástases bilaterais, sete apresentavam lesões bilaterais, cinco eram unilaterais e duas centrais (clitoris).

No grupo contendo metástases ganglionares, observamos o envolvimento da região clitoriana em 16 casos (64%), sendo que cinco pacientes apresentavam metástases unilaterais e onze bilaterais. No grupo desprovido de metástases ganglionares, apenas quatro (21%) apresentavam neoplasia em região clitoriana. O envolvimento do clitoris pelo tumor estava associado à presença de metástases ganglionares ( $p=0,005$ ). A ocorrência de metástases bilaterais estava relacionada à presença de lesões bilaterais e ao envolvimento da região clitoriana ( $p=0,03$ ).

Entre as pacientes com metástases ganglionares, observamos que cinco (20%) apresentavam lesões multifocais e 15 (60%) alterações coilocitóticas. As variantes histológicas estavam distribuídas em: quatro (16%) de padrão basalóide, 18 (72%) do tipo usual e três (12%) condilomatosos. Quatro (16%) tinham epitélio adjacente normal, 16 (64%) com lesões distróficas e cinco (20%) com NIV III.

Dois casos (8%) foram positivos para papilomavírus humanos (um para o antígeno e outro para o DNA viral) e 15 (60%), para a pesquisa da proteína p53.

Em relação à profundidade de invasão estromal, oito casos (32%) eram menores ou iguais a cinco milímetros e 17 (68%), mais de cinco milímetros.

Em oito casos (33,3%) a lesão tumoral era menor ou igual a três centímetros e em 16 (66,7%), maior do que três centímetros.

Quanto ao grau de diferenciação da neoplasia, seis (24%) eram bem diferenciados, 18 (72%) moderadamente e um (4%) pouco diferenciado.

No grupo desprovido de metástases ganglionares, observamos que seis pacientes (31,6%) apresentavam lesões multifocais e nove (47,4%) alterações coilocitóticas.

Quanto à variante histológica, um (5,3%) era de padrão basalóide, 16 (84,1%) do tipo usual, um (5,3%) condilomatoso e um (5,3%) verrucoso. Dez (52,6%) eram bem diferenciados e nove (47,4%) moderadamente diferenciados.

Quatorze (73,7%) tinham lesões distróficas associadas e cinco (26,3%) neoplasia intraepitelial vulvar grau III.

O HPV não estava presente em nenhum caso e em 13 (68,4%) foi detectada a proteína p53.

Doze lesões (75%) eram menores ou iguais a três centímetros no maior eixo e quatro (25%) mediam mais de três centímetros. Onze (57,9%) apresentavam profundidade de invasão menor ou igual a cinco milímetros e oito (42,1%) mais de cinco milímetros.

As variáveis: idade média, focalidade das lesões, o padrão histológico da neoplasia, a presença de alterações coilocitóticas, o tipo de alteração no epitélio adjacente à neoplasia e a detecção do vírus e da proteína p53, não estavam relacionadas à presença ou ausência de metástases ganglionares (Tabela 13).

Mostraram tendência estatística: a profundidade de invasão estromal quando considerado como limite cinco milímetros ( $p=0,08$ ) e o tamanho da lesão, maior ou menor do que dois centímetros no maior eixo ( $p=0,05$ ). Entretanto, se considerarmos como limite a medida de três centímetros, esta foi estatisticamente significativa ( $p=0,006$ ) (Tabela 13).

Também correlacionaram com a presença de metástases ganglionares, o envolvimento da região clitoriana pela neoplasia e o grau de diferenciação do tumor (Tabela 13).

TABELA 13

Comparação de proporções e das idades médias das pacientes em relação à presença ou ausência de metástases ganglionares

|                           | Metástases ausentes<br>(n=19) | Metástases presentes<br>(n=25) | Valor de p |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------|
| Idade média (anos)        | 66,9                          | 67,8                           | 0,8        |
| Multifocalidade           | 31,6%                         | 20%                            | 0,5        |
| Envolvimento do clítoris  | 21%                           | 64%                            | 0,005      |
| Lesão maior do que 3 cm   | 25%                           | 66,7%                          | 0,006      |
| Invasão maior do que 5 mm | 42,1%                         | 68%                            | 0,08       |
| Grau nuclear              |                               |                                |            |
| I                         | 52,6%                         | 24%                            | 0,05       |
| II                        | 47,4%                         | 72%                            | 0,1        |
| III                       | 0%                            | 4%                             | 0,1        |
| HPV positivo              | 0%                            | 8%                             | 0,3        |
| p53 positivo              | 68,4%                         | 60%                            | 0,6        |

n – número total de casos      **Grau nuclear** - I – bem diferenciado, II – moderadamente diferenciado, III – pouco diferenciado  
**HPV positivo** – detecção do papilomavírus humanos através de uma das duas técnicas utilizadas no estudo

### 3.13. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A pesquisa do antígeno do capsídeo viral foi positiva em apenas três casos (5,5%), todos com leve grau de intensidade e localizada no epitélio adjacente de NIV III bowenóide em dois casos e nas células neoplásicas invasoras do carcinoma de padrão histológico basalóide em outro (Figura 28) (Tabela 14).

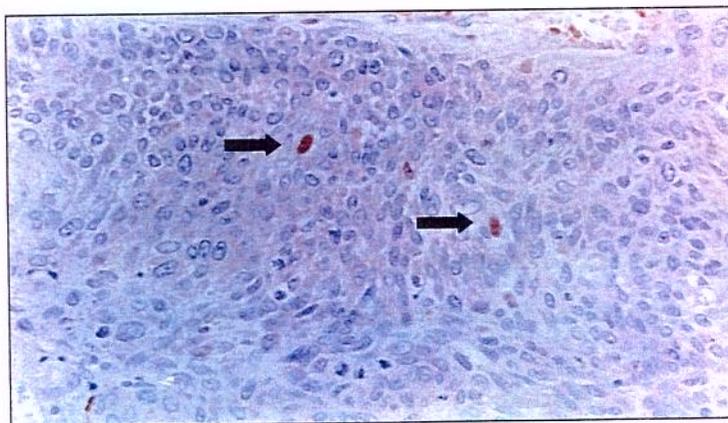


FIGURA 28 – Reação positiva para o antígeno viral em células isoladas do carcinoma escamoso invasivo, variante basalóide (B. 4680/95, IHQ, 40x)

**TABELA 14**  
**Achados mais importantes encontrados em três pacientes com carcinoma invasivo e pesquisa para o antígeno viral positiva**

| Idade | Doença TGF | Focalidade | Variante histológica e profundidade invasão | Coilocitose           | Epitélio adjacente    | HIS HPV | p53 |
|-------|------------|------------|---|-----------------------|-----------------------|---------|-----|
| 38    | sim        | U          | usual (2mm)                                 | ++<br>NIV e condiloma | NIV III b e condiloma | ++ NIV  | -   |
| 54    | sim        | M          | basalóide (10mm)                            | -                     | hiperplasia escamosa  | -       | -   |
| 45    | sim        | M          | basalóide (1,8mm)                           | ++ NIV                | NIV III b             | -       | +   |

HIS HPV = técnica da hibridização molecular *in situ* para a detecção do papilomavírus humanos

U = unifocal; M = multifocal (-) = negativo; (+) = positivo : (+) = leve; (++) = moderado

TGF = doença do trato genital inferior associada NIV III b = neoplasia intraepitelial vulvar grau III, padrão bowenóide

Comparando-se os casos positivos com os negativos para a pesquisa do antígeno do capsídeo viral, observamos que foram estatisticamente significantes através da análise univariada as variáveis: idade média ( $p=0,02$ ) e a detecção do DNA viral pela técnica da hibridização molecular *in situ* ( $p=0,04$ ). Mostrou tendência estatística a variante histológica da neoplasia invasora ( $p=0,06$ ).

Através da análise multivariada para as três variáveis significantes, observamos que somente a idade mostrou correlação com o resultado da reação ( $p=0,02$ ), onde concluímos que quanto mais jovem a paciente, maior é a chance de se detectar o antígeno do capsídeo do HPV.

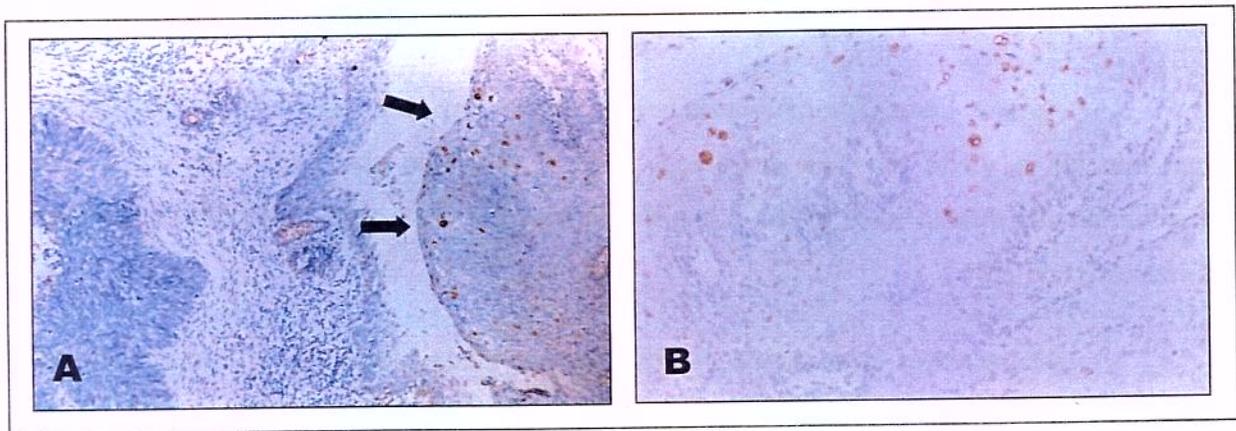
As pacientes com exame positivo tinham idade média de 45,7 anos e desvio padrão de 8, sendo que todas apresentavam outra patologia associada no trato genital inferior. No grupo negativo, a idade média foi de 69 anos e desvio padrão de 11,5 e apenas uma tinha lesão multicêntrica.

Não foram significantes: a presença de lesões multifocais e multicêntricas, o grau de diferenciação e a profundidade de invasão do tumor, a presença e o grau de coilocitose, a alteração do epitélio adjacente à neoplasia, a presença de metástases ganglionares e a detecção da proteína p53.

### 3.14. DETECÇÃO DO DNA VIRAL ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU*

Reação positiva para a pesquisa do DNA viral foi detectada em apenas dois casos (3,6%), ambos para o HPV tipo 16/18, com moderado grau de intensidade e localizada no terço superior do epitélio de NIV III padrão histológico bowenóide:

- paciente com 47 anos, não associada a outra doença associada no trato genital inferior, com lesão unifocal e variante histológica basalóide (Figura 29). Apresenta condiloma adjacente. Reação de imuno-histoquímica para o HPV e p53 negativas;
- paciente com 38 anos, contendo neoplasia intraepitelial vaginal grau II associada, lesão unifocal e do tipo histológico usual queratinizante. Apresenta condiloma adjacente, pesquisa para o antígeno viral positiva, de grau leve no epitélio de NIV III e reação negativa para a proteína p53.



**FIGURA 29 - Hibridização molecular *in situ* positiva para o HPV 16/18 no epitélio com NIV III adjacente ao carcinoma invasivo padrão basalóide (B.56681/91, HIS)**

A) Aumento: 10x

B) Pormenor: aumento:20x

Comparando-se o grupo de pacientes onde o DNA do HPV estava presente com o grupo de resultado negativo, através da análise univariada, houve correlação entre as idades médias ( $p=0,05$ ), respectivamente 42,5 anos (desvio padrão de 6,4) e 68,7 anos (desvio padrão de 11,6) e também, com o resultado da reação da imuno-histoquímica para a detecção do antígeno viral ( $p=0,04$ ). A presença de lesões multicêntricas mostrou tendência

estatística ( $p=0,07$ ). Entretanto, na análise multivariada, apenas a idade permaneceu relacionada à detecção do DNA viral ( $p=0,05$ ), com as pacientes de grupo etário mais jovem apresentando maior chance de ter resultado positivo através da técnica de hibridização molecular *in situ*. A detecção do DNA do HPV não estava relacionada com a presença e o grau das alterações coilocitóticas, à variante histológica da neoplasia, à presença de lesões multifocais ou da proteína p53.

### 3.15. RELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU* PARA A DETECÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

Dentre os 55 casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva, quatro (7,3%) foram positivos para a pesquisa do HPV através das técnicas de imuno-histoquímica ou hibridização molecular *in situ*. Entretanto, somente um caso foi positivo para ambos os métodos (Tabela 15).

TABELA 15

Relação entre as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização molecular *in situ* para a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma escamoso invasivo vulvar

|                                  | <u>Hibridização molecular <i>in situ</i></u> |                 | <i>Total</i> |
|----------------------------------|--|-----------------|--------------|
|                                  | casos positivos                              | casos negativos |              |
| <u><i>Imuno-histoquímica</i></u> |  |                 |              |
| casos positivos                  | 1  | 2               | 3            |
| casos negativos                  | 1  | 51              | 52           |
| <i>Total</i>                     | 2  | 53              | 55           |

$p$  (Fisher) = 0,11

HPV: papilomavírus humanos

A tabela abaixo (Tabela 16) mostra os principais achados nos grupos de pacientes com resultado positivo e negativo para a pesquisa do papilomavírus humanos.

TABELA 16

Relação entre detecção do papilomavírus humanos e as variáveis analisadas

| Variáveis                     | HPV positivo (4 casos)                             | HPV negativo (51 casos)  | Significância estatística *                 |
|-------------------------------|--|--|---|
| Idade média                   | 46 anos (DP 6,6)                                   | 69,5 anos (DP 11,2)  | p=0,008                                     |
| Lesões multicêntricas         | 3 (75%)  | 1 (1,9%)   | p=0,001                                     |
| Lesões multifocais            | 2 (50%)  | 11 (21,6%)   | NS  |
| Tipo histológico da neoplasia | 1 (25%) queratinizante<br>3 (75%) basalóide        | 42 (82,4%) queratinizante<br>3 (5,9%) basalóide<br>4 (7,8%) condilomatoso<br>2 (3,9%) verrucosos | p=0,02<br>(basalóide x as outras variantes) |
| Epitélio adjacente            | 1 (25%) hiperplasia escamosa<br>3 (75%) NIV III ** | 8 (15,7%) normal<br>32 (62,7%) distrofia<br>11 (21,6%) NIV III                                   | NS  |
| Proteína p53                  | 1 (25%) grau leve                                  | 31 (60,8%)   | NS  |

HPV: papilomavírus humanos

DP: desvio padrão

NS: não significante ( $p > 0,05$ )

\* análise univariada

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

\*\* duas tinham condiloma associado ao NIV III

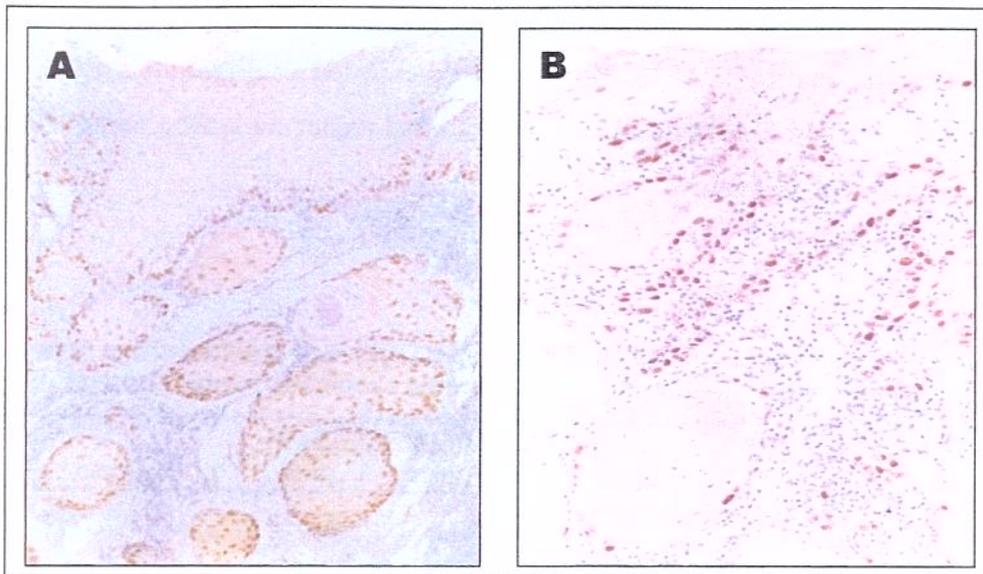
Através da análise multivariada, a detecção do vírus continuou associada à variável idade ( $p=0,05$ ) e multicêntridade ( $p=0,04$ ), onde pacientes de grupo etário mais jovem e com lesões multicêntricas possuem maior probabilidade de apresentarem o HPV.

### 3.16. DETECÇÃO DA PROTEÍNA P53 ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Sinal positivo para a proteína p53 foi identificado em 32 casos (58,2%), com leve grau de intensidade em seis (18,8%), moderado em 20 (62,5%) e intenso em seis (18,8%) (Figuras 30 e 31).

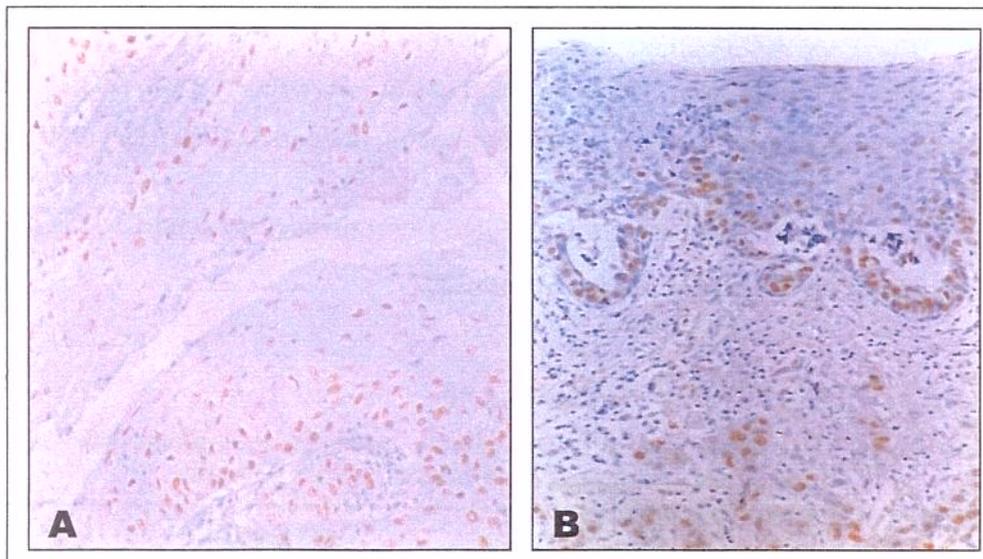
A reação positiva estava localizada somente nas áreas de carcinoma invasivo em 22 casos (68,7%) e apenas no epitélio adjacente à área de invasão em três (9,4%) (um na área de invasão superficial, outro no epitélio de NIV III bowenóide e um caso na lesão de hiperplasia escamosa). Em sete casos (21,9%) estava presente na área de invasão, bem como nas lesões adjacentes classificadas como: doença de Paget (um caso), NIV I com hiperplasia escamosa (um caso), NIV II (um caso), na área de invasão superficial em um e NIV III (três casos), sendo que em um também foi positivo no epitélio de NIV I associado (Figuras 30 e 31).

As células coradas foram identificadas na camada basal do epitélio, ou predominantemente na metade externa dos blocos tumorais invasivos, com distribuição difusa dentro da neoplasia em 21 casos (65,6%) e focal em onze (34,4%).



**FIGURA 30 - Reação positiva para a proteína p53 em carcinoma invasivo queratinizante, com distribuição difusa, predominantemente nas camadas mais externas dos blocos tumorais**

- A) Bem diferenciado (B.13986/87, IHQ, 10x)
- B) Moderadamente diferenciado (B.60387/91, IHQ, 20x)



**FIGURA 31 – Reação positiva para a proteína p53 em carcinoma invasivo (IHQ)**

- A) Carcinoma invasivo padrão condilomatoso (B. 9981/95, 20x)
- B) Epitélio contendo células atípicas pagetóides e no carcinoma invasivo usual pouco diferenciado subjacente (B. 12571/95, 20x)

A idade média das pacientes onde foi detectada a proteína era de 67,3 anos, com desvio padrão de 13,1. Uma paciente (3,1%) apresentava lesão multicêntrica e oito (25%) lesões multifocais.

As variantes histológicas estavam representadas por (Tabela 17): duas (6,2%) de padrão basalóide, quatro (12,5%) condilomatosos e 26 (81,2%) queratinizantes. Quatro (12,5%) apresentavam profundidade de invasão estromal menor ou igual a três milímetros e 28 (87,5%) mais de três milímetros.

**TABELA 17**

**Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos, com as variantes histológicas do carcinoma escamoso invasivo vulvar**

|            |          | <i>Subtipos histológicos</i> |               |       |           | <i>Total</i> |
|------------|----------|------------------------------|---------------|-------|-----------|--------------|
|            |          | basalóide                    | condilomatoso | usual | verrucoso |              |
| <i>p53</i> | negativo | 4                            | 0             | 17    | 2         | 23           |
|            | positivo | 2                            | 4             | 26    | 0         | 32           |
| <i>HPV</i> | negativo | 3                            | 4             | 42    | 2         | 51           |
|            | positivo | 3                            | 0             | 1     | 0         | 4            |

HPV: papilomavírus humanos

Alterações coilocitóticas estavam presentes em 22 casos (68,7%) e metástases ganglionares em 15 (46,9%). Três (9,4%) mostravam epitélio adjacente à neoplasia invasora sem alterações, 20 (62,5%) continham lesões distróficas, oito (25%) NIV III (quatro da variante bowenóide e quatro basalóides) e um, doença de Paget da vulva.

O papilomavírus humanos foi detectado em apenas um caso (3,1%), somente através da técnica de imuno-histoquímica (Tabela 18).

**TABELA 18**

**Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos no carcinoma escamoso invasivo da vulva**

|              | p53 negativo | p53 positivo | <i>Total</i> |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| HPV negativo | 20           | 31           | 51           |
| HPV positivo | 3            | 1            | 4            |
| <i>Total</i> | 23           | 32           | 55           |

*p* (Fisher) = 0,30

HPV: papilomavírus humanos

No grupo com resultado negativo para a pesquisa da proteína p53, a idade média das pacientes foi de 68,4 anos e desvio padrão de 11,8.

Três (13%) apresentavam lesões multicêntricas e cinco (21,7%) multifocais.

As variantes histológicas estavam representadas por (Tabela 17): quatro (17,4%) basalóides, 17 (73,9%) do tipo usual e duas (8,7%) de padrão verrucoso. A profundidade de invasão estromal era menor ou igual a três milímetros em oito casos (34,8%) e mais de três milímetros em 15 (65,2%).

Oito lesões (34,8%) apresentavam alterações coilocitóticas e dez (43,5%) metástases ganglionares.

O epitélio adjacente à neoplasia invasora não mostrava alterações em quatro casos (17,4%), apresentava lesões distróficas em 13 (56,5%) e NIV III em seis (26,1%).

O papilomavírus foi detectado em três casos (13%) (Tabela 18).

Notamos correlação entre a profundidade de invasão estromal e a detecção (mas não com a intensidade da reação) da proteína p53 ( $p=0,04$ ), quando estabelecemos como limite a profundidade de três milímetros. Entretanto, quando aumentamos este limite para cinco milímetros, a distribuição dos casos positivos e negativos foi semelhante entre os dois grupos de pacientes.

A presença de alterações coilocitóticas também estava associada à detecção da proteína p53 ( $p=0,01$ ), através das análises univariada e multivariada, sendo que a presença de coilocitose estava relacionada a um maior índice de detecção da proteína p53.

Não observamos correlação entre a detecção da proteína p53 e a idade média das pacientes, a presença de lesões multicêntricas e multifocais e de metástases ganglionares, o tipo histológico e o grau de diferenciação da neoplasia, ou com a detecção do papilomavírus humanos.

### 3.17. PACIENTES COM RECIDIVA DA NEOPLASIA

Em nove casos (16,4%) observamos recidiva da neoplasia, sendo que esta ocorreu em menos de um ano em seis pacientes (66,7%) e nas três restantes, após cinco, seis e sete anos, respectivamente. A análise da recidiva foi realizada apenas com os casos que foram identificados durante o período do levantamento, isto é, entre 1983 e 1995.

Em apenas um caso (11,1%) havia envolvimento das margens e em quatro (44,4%), metástases ganglionares, identificados nas peças provenientes do primeiro tratamento cirúrgico.

Sete pacientes (77,8%) tinham lesões unifocais. Destas, cinco (55,5%) apresentavam lesões menores ou iguais a três centímetros no maior eixo e profundidade de invasão estromal menor ou igual a cinco milímetros em três (33,3%). O grau histológico era bem diferenciado em três e moderadamente diferenciado em quatro casos.

Duas apresentavam lesões multifocais, ambas medindo menos de três centímetros nos maiores eixos, com profundidade de invasão menor do que cinco milímetros e grau histológico moderadamente diferenciado.

A presença de recidiva estava associada com idade média mais jovem ( $p=0,0002$ ), sendo que a idade média das pacientes com recidiva era de 54,6 anos e desvio padrão de 13,8 e a do grupo que não apresentou recidiva no período examinado, 70,3 anos e desvio padrão de 10,5.

Não foi observada relação entre recidiva e os outros parâmetros analisados, incluindo a detecção do papilomavírus humanos e da proteína p53.

#### 4. ASSOCIAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DOS TRÊS GRUPOS DE PACIENTES

A Figura 32 mostra o número total de lesões diagnosticadas como neoplasia intraepitelial vulvar grau III, carcinoma escamoso superficialmente invasivo e invasivo da vulva, no período compreendido entre 1983 e 1995, embora não tenham sido incluídos todos os casos para a realização deste trabalho.

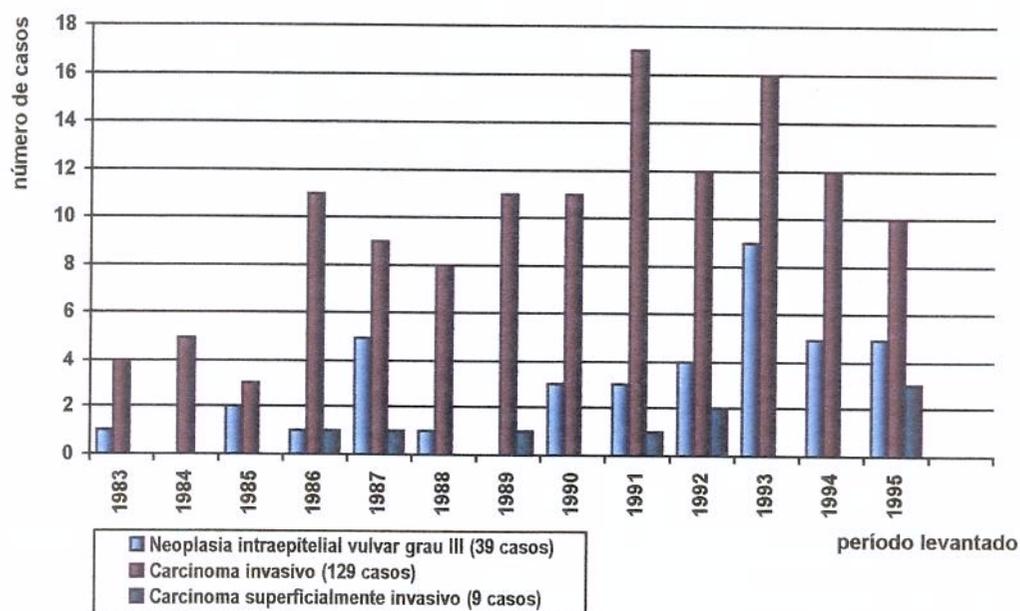


FIGURA 32 - Número total de casos de NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e invasivo da vulva, levantados entre 1983 e 1995

Na tabela abaixo (Tabela 19) estão representados os dados mais importantes encontrados nestes três grupos de pacientes, isto é, contendo lesões de NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma escamoso invasivo vulvar.

TABELA 19

Características mais importantes encontradas nos três grupos de pacientes

|                         | NIV III (n=38) | Carcinoma SI (n=9) | Carcinoma invasivo (n=55) | Valor de p |
|-------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|------------|
| Idade média (anos)      | 47,5           | 57,9               | 67,8                      | 0,0001     |
| Lesões multicêntricas   | 14 (36,8%)     | 5 (55,6%)          | 4 (7,3%)                  | 0,0002     |
| Lesões multifocais      | 13 (34,2%)     | 5 (55,6%)          | 13 (23,6%)                | 0,12       |
| Presença de coilocitose | 29 (76,3%)     | 9 (100%)           | 30 (54,5%)                | 0,008      |
| Condiloma associado     | 16 (42,1%)     | 2 (22,2%)          | 4 (7,3%)                  | 0,0003     |
| IHQ HPV positiva        | 13 (34,2%)     | 3 (33,3%)          | 3 (5,5%)                  | 0,001      |
| HIS HPV positiva*       | 17 (44,7%)     | 2 (22,2%)          | 2 (3,6%)                  | < 0,0001   |
| Presença do HPV         | 22 (57,9%)     | 3 (33,3%)          | 4 (7,3%)                  | < 0,0001   |
| IHQ p53 positiva        | 8 (21,1%)      | 6 (66,7%)          | 32 (58,2%)                | 0,0007     |

NIV III = neoplasia intraepitelial vulvar grau III

SI = carcinoma escamoso superficialmente invasivo

HPV = papilomavirus humanos

IHQ = imuno-histoquímica

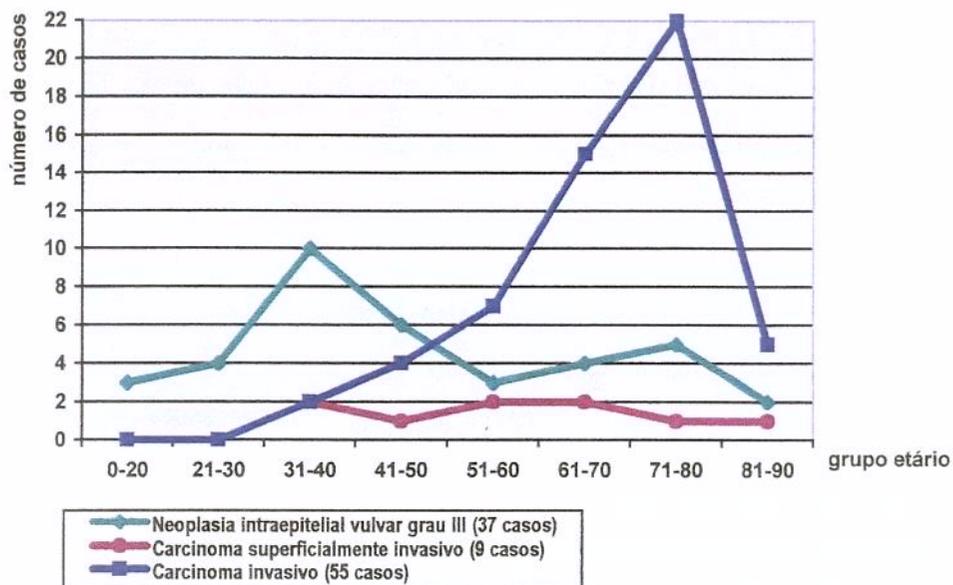
HIS = hibridização molecular *in situ*

Presença do HPV = presença do vírus detectado através das técnicas de IHQ ou HIS

\* HPV de alto risco (16/18) presente em 94% de NIV III e 100% de carcinoma superficialmente invasivo e invasivo

#### 4.1. DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA

Observamos uma diferença significativa ( $p=0,0001$ ), de aproximadamente dez anos entre cada grupo de pacientes (Tabela 19), secundária à diferença entre a idade média do grupo com carcinoma invasivo quando comparado com aquelas contendo lesões de NIV III ( $p<0,0001$ ) e de carcinoma superficialmente invasivo ( $p=0,04$ ). Entretanto, não houve diferença significativa do ponto de vista estatístico entre o grupo apresentando lesão de NIV III e de carcinoma superficialmente invasivo. A Figura 33 mostra a distribuição por faixa etária das pacientes nos três grupos de lesões.



**FIGURA 33 – Idade das pacientes com NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma invasivo da vulva**

Através da análise estatística, observamos diferença significativa na distribuição do número de pacientes apresentando idade inferior ou igual e superior a 40, 50 e 60 anos, nos três grupos de lesões ( $p < 0,001$ ); e também quando comparamos o grupo contendo carcinoma escamoso invasivo com o de NIV III ( $p < 0,001$ ). Entretanto, não houve diferença entre as pacientes contendo carcinoma superficialmente invasivo com as que apresentavam lesões de NIV III ou carcinoma invasivo (Tabela 20).

**TABELA 20**

**Distribuição por grupo etário das pacientes contendo NIV III, carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma invasivo da vulva**

|   | <u>Grupos etários</u> |            |            |            |            |            |
|---|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|   | ≤ 40                  | > 40       | ≤ 50       | > 50       | ≤ 60       | > 60       |
| <b>Neoplasia intraepitelial vulvar III (n=37)</b> | 17 (45,9%)            | 20 (54,1%) | 23 (62,2%) | 14 (37,8%) | 26 (70,3%) | 11 (29,7%) |
| <b>Carcinoma superficialmente invasivo (n=9)</b>  | 2 (22,2%)             | 7 (77,8%)  | 3 (33,3%)  | 6 (66,7%)  | 5 (55,6%)  | 4 (44,4%)  |
| <b>Carcinoma invasivo (n=55)</b>                  | 2 (3,6%)              | 53 (96,4%) | 6 (10,9%)  | 49 (89,1%) | 13 (23,6%) | 42 (76,4%) |

## 4.2. ETNIA

A maioria das pacientes nos três grupos era caucasóide. Entretanto, o número de afro-brasileiras ou descendentes, era proporcionalmente maior no grupo contendo NIV III ( $p=0,03$ ) (Tabela 21).

**TABELA 21**  
**Distribuição étnica nos três grupos de pacientes**

|                                     | Caucasóides       | Descendentes afro-brasileiras | Afro-brasileiras |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------|------------------|
| Neoplasia intraepitelial vulvar III | 24 (75%)          | 3 (9,4%)                      | 5 (15,6%)        |
| Carcinoma superficialmente invasivo | 7 (87,5%)         | 1 (12,5%)                     | 0                |
| Carcinoma invasivo                  | 51 (92,7%)        | 3 (5,5%)                      | 1 (1,8%)         |
| <b>Total</b>                        | <b>82 (86,3%)</b> | <b>7 (7,4%)</b>               | <b>6 (6,3%)</b>  |

$p$  (Fischer) = 0,07

## 4.3. TIPO DE CIRURGIA REALIZADA

Os espécimes enviados para análise, considerando-se os três grupos de lesões, estavam representados por (Tabela 22):

**TABELA 22**  
**Tipos de peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico nos três grupos de pacientes**

|                                     | <u>Peças cirúrgicas</u> |            |            |            |            |
|-------------------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                                     | Biópsia                 | Ressecção  | V. parcial | V. simples | V. radical |
| Neoplasia intraepitelial vulvar III | 22 (57,9%)              | 11 (28,9%) | 3 (7,5%)   | 2 (5,3%)   | 0          |
| Carcinoma superficialmente invasivo | 2 (22,2%)               | 1 (11,1%)  | 3 (33,3%)  | 0          | 3 (33,3%)  |
| Carcinoma invasivo                  | 1 (1,8%)                | 2 (3,6%)   | 1 (1,8%)   | 13 (23,6%) | 38 (69,1%) |

V. = vulvectomy

#### 4.4. HISTÓRIA DE OUTRAS LESÕES ASSOCIADAS NO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

A presença de outras lesões associadas no trato genital feminino inferior está demonstrada na tabela abaixo (Tabela 23).

**TABELA 23**  
**Distribuição das lesões multicêntricas e idades médias correspondentes nos três grupos de pacientes**

|  | <u>Lesões multicêntricas relacionadas</u> |             | <u>Lesões multicêntricas não relacionadas</u> |             |
|--|---|-------------|---|-------------|
|  | Número de casos                           | Idade média | Número de casos                               | Idade média |
| Neoplasia intraepitelial vulvar III (n=38) | 14 (36,8%)                                | 44,8        | 24 (63,2%)                                    | 48,9        |
| Carc. superficialmente invasivo (n=9)      | 5 (55,6%)                                 | 54,4        | 4 (44,4%)                                     | 62,2        |
| Carcinoma invasivo (n=55)                  | 4 (7,3%)                                  | 53,5        | 51 (92,7%)                                    | 68,9        |
| <b>Total (n=102)</b>                       | <b>23 (22,6%)</b>                         | <b>48,6</b> | <b>79 (77,4%)</b>                             | <b>62,5</b> |

Carc.: carcinoma

n: número de casos

Notamos diferença significativa entre os três grupos ( $p=0,0002$ ) em relação à presença de lesões multicêntricas, secundária ao baixo índice de multicentricidade nas pacientes com carcinoma escamoso invasivo quando comparadas com as contendo lesões de NIV III ( $p=0,001$ ) e de carcinoma superficialmente invasivo ( $p=0,002$ ) (Tabela 23). Entretanto, esta diferença não foi significativa entre as lesões de NIV III e carcinoma superficialmente invasivo.

As idades médias das pacientes com lesões multicêntricas nos três grupos foram semelhantes (Tabela 23). Entretanto, observamos diferença entre os três grupos de pacientes onde não havia relato de outras patologias associadas ( $p<0,0001$ ), bem como entre aquelas apresentando NIV III e carcinoma invasivo ( $p=0,04$ ).

Somando-se os três grupos, notamos que a idade média das pacientes contendo lesões multicêntricas foi significativamente inferior ao do grupo onde não havia relato de outras patologias associadas ( $p=0,001$ ) (Tabela 23).

Dos 23 casos com lesões multicêntricas, 60,9% eram NIV III, 21,7% carcinoma superficialmente invasivo e 17,4% carcinoma invasivo.

#### 4.5. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS LESÕES

Na análise de cada grupo separadamente, observamos que as alterações discrômicas ocorreram predominantemente nas pacientes contendo lesões de NIV III (70,8%), sendo que 33% delas apresentavam apenas discromia ao exame físico. Lesão discrômica isolada não foi identificada no grupo com carcinoma superficialmente invasivo e estava presente em somente dois casos (3,6%) de carcinoma invasivo.

Em contrapartida, lesões elevadas foram mais freqüentemente notadas nas pacientes com carcinoma invasivo (92,7%), seguido pelo carcinoma superficialmente invasivo (71,4%) e NIV III (29,2%).

#### 4.6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

O envolvimento de uma ou mais regiões da vulva, a lateralidade e o seu local, estão relacionados na tabela abaixo, sendo que não observamos de uma maneira geral, diferença significativa entre os três grupos de lesões (Tabela 24).

TABELA 24

Distribuição topográfica das lesões vulvares nos três grupos de pacientes

|                             | NIV III (%) | Carcinoma SI (%) | Carcinoma invasivo (%) |
|-----------------------------|-------------|------------------|------------------------|
| Apenas uma região da vulva  | 56          | 75               | 42                     |
| Mais de uma região da vulva | 44          | 25               | 58                     |
| Unilateral                  | 30          | 37               | 40                     |
| Unilateral e central        | 15          | 0                | 14                     |
| Direita                     | 60          | 100              | 57                     |
| Esquerda                    | 40          | 0                | 43                     |
| Bilateral                   | 11          | 0                | 13                     |
| Bilateral e central         | 18          | 13               | 20                     |
| Central                     | 26          | 50               | 13                     |
| Grandes lábios              | 33          | 31               | 30                     |
| Pequenos lábios             | 33          | 31               | 48                     |
| Clitoris                    | 4           | 8                | 19                     |
| Fúrcula                     | 24          | 8                | 0                      |
| Períneo                     | 6           | 23               | 3                      |

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

Carcinoma SI: carcinoma superficialmente invasivo

#### 4.7. FOCALIDADE DAS LESÕES

A distribuição de lesões multifocais e unifocais entre os três grupos foi semelhante (Tabela 19).

Não houve diferença significativa entre as idades médias dos três grupos de pacientes apresentando lesões multifocais ou unifocais.

Do total de 102 pacientes, 31 (30,4%) apresentavam lesões multifocais, correspondendo a 13 casos de NIV III (41,9%), cinco carcinomas superficialmente invasivos (16,1%) e 13 carcinomas invasivos (41,9%).

Lesões unifocais estavam presentes em 51 pacientes (50%) e representadas por cinco casos de NIV III (9,8%), quatro carcinomas superficialmente invasivos (7,8%) e 42 carcinomas invasivos (82,4%).

Observamos diferença significativa entre as idades médias das pacientes contendo lesões unifocais e multifocais ( $p=0,004$ ), respectivamente, 67,2 (desvio padrão de 14,4) e 57,3 anos (desvio padrão de 14,9).

#### 4.8. ALTERAÇÕES EPITELIAIS ADJACENTES

Resumidamente, observamos no grupo de pacientes com lesões de NIV III: epitélio adjacente de aspecto normal em 16 casos (45,7%), hiperplasia escamosa em dois (5,7%) e condiloma em 16 (45,7%).

As pacientes com carcinoma superficialmente invasivo mostravam NIV III de padrão bowenóide no epitélio adjacente à lesão invasiva em oito casos (88,9%), sendo que dois (22,2%) estavam associados a condiloma plano viral. Em um, o epitélio adjacente não apresentava alterações.

No grupo contendo carcinoma invasivo, seis (10,9%) não mostravam alterações epiteliais adjacentes, 16 (29,1%) tinham hiperplasia escamosa e 17 (30,1%), líquen escleroso. Quatorze (25,5%) apresentavam neoplasia intraepitelial vulvar grau III (seis de padrão bowenóide e oito basalóides) e quatro (7,3%) tinham condiloma viral associado.

Notamos diferença entre os três grupos de pacientes quanto à distribuição das lesões de condiloma ( $p=0,0003$ ) e de hiperplasia escamosa ( $p=0,02$ ).

Não observamos diferença entre as idades médias das pacientes dos três grupos apresentando lesão de NIV III padrão histológico bowenóide. Entretanto, esta diferença foi significativa ( $p=0,008$ ) naquelas contendo NIV III da variante basalóide, sendo a idade média do grupo com lesão de NIV III (44,3 anos) significativamente menor quando comparada àquelas contendo carcinoma invasivo associado a NIV III basalóide no epitélio adjacente (67,6 anos).

Do mesmo modo, também não havia diferença entre as idades médias dos três grupos de pacientes contendo lesão de condiloma. Além disso, a presença de condiloma estava associada à idade mais jovem quando comparado com as pacientes desprovidas de condiloma apenas no grupo contendo carcinoma escamoso invasivo.

Se considerarmos todas as pacientes apresentando NIV III como lesão primária ou associada, e compararmos a idade média de 52,4 anos (desvio padrão de 19,2) com o grupo desprovido de NIV III, que foi de 69,3 anos (desvio padrão de 11,8), observamos diferença significativa ( $p<0,0001$ ).

Também notamos tendência estatística ( $p=0,09$ ) entre as idades médias das pacientes contendo a variante histológica bowenóide de NIV III e a do grupo de padrão basalóide, respectivamente, 50,4 (desvio padrão 19,6) e 61,3 anos (desvio padrão 15,1).

Lesão de condiloma estava presente em 22 do total de 102 pacientes (21,6%), com idade média de 47,6 anos (desvio padrão 19,1) e ausente nos 77 casos restantes (75,5%) onde havia epitélio adjacente passível de avaliação, com idade média de 63,6 anos (desvio padrão 16,4), diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0002$ ). O condiloma estava presente predominantemente no grupo de pacientes com lesão de NIV III (72,7%) (Tabela 19), sendo que a maioria que não apresentava condiloma era de pacientes com carcinoma invasivo (66,2%).

#### 4.9. SINAIS HISTOLÓGICOS SUGESTIVOS DE INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

A tabela abaixo (Tabela 25) mostra a distribuição das alterações coilocitóticas nos três grupos de pacientes, onde notamos que a ausência de coilocitose, ou a sua presença em grau leve ocorreu predominantemente nas pacientes com carcinoma invasivo. Nos grupos contendo lesão de NIV III e de carcinoma superficialmente invasivo, a distribuição do número de casos negativos ou com coilocitose de grau leve foi semelhante aos de grau moderado e intenso.

**TABELA 25**  
**Intensidade e localização das alterações histológicas sugestivas de infecção viral nos três grupos de pacientes**

|   | <i>Alterações coilocitóticas</i> |              |                  |                 | <i>Total</i> |
|---|----------------------------------|--------------|------------------|-----------------|--------------|
|   | <i>ausentes</i>                  | <i>leves</i> | <i>moderadas</i> | <i>intensas</i> |              |
| <b>Neoplasia intraepitelial vulvar grau III</b> | 9 (23,7%)                        | 9 (23,7%)    | 9 (23,7%)        | 11 (28,9%)      | 38           |
| <b>Carcinoma superficialmente invasivo</b>      | 0                                | 5 (55,6%)    | 3 (33,3%)        | 1 (11,1%)       | 9            |
| <b>Carcinoma invasivo</b>                       | 25 (45,5%)                       | 21 (38,2%)   | 8 (14,5%)        | 1 (1,8%)        | 55           |
| <b>Total</b>                                    | 34 (33,3%)                       | 35 (34,3%)   | 20 (19,6%)       | 13 (12,7%)      | 102          |

A presença de alterações coilocitóticas ( $p=0,008$ ) e a sua intensidade ( $p=0,01$ ) mostraram diferenças significantes na sua distribuição entre os três grupos de pacientes, com maior proporção de casos positivos e de grau mais intenso no grupo com lesão de NIV III (Tabelas 19 e 25). Em relação à presença de coilocitose, esta diferença foi secundária ao grupo de carcinoma invasivo quando comparado com as pacientes contendo lesões de NIV III ( $p=0,02$ ) e carcinoma superficialmente invasivo ( $p=0,008$ ). A intensidade das alterações coilocitóticas mostrou diferença na sua distribuição entre o grupo com carcinoma invasivo e com NIV III ( $p=0,001$ ).

Notamos apenas diferença entre as idades médias das pacientes contendo lesões de NIV III e de carcinoma invasivo, tanto para aquelas desprovidas de coilocitose, respectivamente 41 e 71,3 anos ( $p=0,001$ ), quanto para as contendo alterações coilocitóticas ( $p=0,07$ ), respectivamente, 49,5 e 64,8 anos.

A idade média das 68 pacientes apresentando alterações coilocitóticas foi de 57,5 anos, com desvio padrão de 18,1 e do grupo desprovido de coilocitose, 63,3 anos e desvio padrão de 18,7, diferença estatisticamente não significativa. Entretanto, se juntarmos as pacientes não apresentando coilocitose com as de grau leve e compararmos com o grupo contendo alterações coilocitóticas de grau moderado e intenso, observamos diferença ( $p=0,009$ ) entre as idades médias, respectivamente, 62,6 (desvio padrão 17,6) e 52,5 anos (desvio padrão 18,6).

#### **4.10. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA**

A detecção do antígeno do capsídeo viral mostrou diferença significativa entre os três grupos ( $p=0,001$ ) (Tabela 19), secundário ao baixo índice de positividade nas pacientes com carcinoma invasivo quando comparadas com aquelas contendo lesões de NIV III ( $p=0,0003$ ) e carcinoma superficialmente invasivo ( $p=0,03$ ).

As idades médias entre os três grupos de pacientes apresentando o antígeno viral foram semelhantes, variando de 43,7 a 46 anos. Entretanto, observamos diferença significativa ( $p<0,0001$ ) entre as pacientes contendo NIV III e carcinoma invasivo com resultado negativo para a pesquisa do antígeno viral, com idades médias de 49,5 e 69 anos, respectivamente.

A Tabela 26 mostra a distribuição das variáveis mais importantes em relação ao resultado da técnica de imuno-histoquímica para a pesquisa do antígeno do capsídeo viral, quando agrupamos os três grupos de pacientes do estudo.

A detecção viral ocorreu em 19 casos (18,6%), correspondendo a 13 lesões de NIV III (68,4%), três (15,8%) carcinomas superficialmente invasivos e três (15,8%) carcinomas invasivos.

TABELA 26

Achados mais importantes relacionados ao resultado da imuno-histoquímica para a detecção do papilomavírus humanos associando-se os três grupos de pacientes

|                                      | IHQ positiva (n=19) | IHQ negativa (n=83) | Valor de p |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|------------|
| Idade média (anos)                   | 44,4                | 62,9                | 0,0003     |
| Lesões multicêntricas                | 10 (52,6%)          | 13 (15,7%)          | 0,001      |
| Lesões multifocais                   | 8 (42,1%)           | 23 (27,7%)          | 0,01       |
| Condiloma associado                  | 9 (47,4%)           | 13 (15,7%)          | 0,004      |
| Alterações coilocitóticas presentes  | 16 (84,2%)          | 52 (62,6%)          | 0,08       |
| Hibridização <i>in situ</i> positiva | 11 (57,9%)          | 10 (12%)            | 0,0001     |
| p53 positiva                         | 6 (31,6%)           | 40 (48,2%)          | 0,2        |

IHQ: imuno-histoquímica

Podemos notar diferença significativa entre as pacientes contendo o antígeno viral com relação à idade média, à presença de lesões multicêntricas, multifocais e de condiloma associado e também, com o resultado da pesquisa do DNA viral através da técnica da hibridização molecular *in situ*.

Embora a presença de alterações coilocitóticas mostrasse apenas tendência estatística, observamos correlação entre o grau de intensidade da coilocitose com o resultado da técnica de imuno-histoquímica ( $p < 0,0001$ ). A presença da proteína p53 não estava associada à detecção do antígeno viral.

Através da análise de regressão logística, observamos que a detecção do antígeno do capsídeo viral estava associada à presença de lesões multicêntricas ( $p = 0,001$ ) e mostrou tendência para a presença de lesões multifocais ( $p = 0,09$ ) e de condiloma ( $p = 0,07$ ).

#### 4.11. DETECÇÃO DO DNA VIRAL ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU*

Observamos maior número de casos positivos e de grau mais intenso nas pacientes apresentando NIV III (Tabela 19), sendo esta diferença secundária ao grupo com lesões de NIV III em relação àquelas contendo carcinoma escamoso invasivo ( $p < 0,0001$ ).

As idades médias entre os três grupos de pacientes apresentando hibridização molecular *in situ* positiva foram semelhantes, variando de 38,8 a 45,5 anos. Entretanto,

notamos diferença ( $p=0,001$ ) entre os três grupos com resultado negativo, secundário à diferença entre as idades médias das pacientes com lesão de NIV III (54,8 anos) e de carcinoma invasivo (68,7 anos).

Do total de 102 casos, 21 (20,6%) apresentavam o DNA viral, correspondendo a 17 lesões de NIV III (81%), dois casos (9,5%) de carcinoma superficialmente invasivo e dois (9,5%) de carcinoma invasivo.

A tabela abaixo (Tabela 27) mostra os achados mais importantes associados à detecção do DNA do papilomavírus humanos.

**TABELA 27**  
**Achados mais importantes relacionados à detecção do DNA dos papilomavírus humanos associando-se os três grupos de pacientes**

|                                     | HIS positiva (n = 21) | HIS negativa (n = 81) | Valor de p    |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|
| Idade média (anos)                  | 39,8                  | 64,6                  | <b>0,0001</b> |
| Lesões multicêntricas               | 9 (42,8%)             | 14 (17,3%)            | <b>0,02</b>   |
| Lesões multifocais                  | 5 (23,8%)             | 26 (32,1%)            | 0,3           |
| Condiloma associado                 | 13 (61,9%)            | 9 (11,1%)             | <b>0,0001</b> |
| Alterações coilocitóticas presentes | 17 (80,9%)            | 51 (62,9%)            | 0,1           |
| Imuno-histoquímica positiva         | 11 (52,4%)            | 8 (9,9%)              | <b>0,0001</b> |
| p53 positiva                        | 6 (28,6%)             | 40 (49,4%)            | 0,09          |

HIS: hibridização molecular *in situ*

Pudemos observar correlação entre o resultado desta técnica com as idades médias das pacientes, com a presença de lesões multicêntricas, de condiloma e com a detecção do antígeno viral. Mostrou tendência estatística com a presença da proteína p53.

Embora não tenha mostrado relação com a presença de alterações coilocitóticas, observamos correlação entre a intensidade da coilocitose e o resultado positivo ou negativo da técnica de hibridização molecular *in situ* ( $p=0,001$ ).

Através da análise de regressão logística, notamos que a presença de idade mais jovem ( $p=0,0001$ ) e do antígeno do capsídeo viral ( $p=0,02$ ), permaneceram correlacionadas à detecção do DNA do papilomavírus humanos.

#### 4.12. PRESENÇA DO HPV, DETECTADO ATRAVÉS DE UMA OU OUTRA TÉCNICA

O número de casos positivos foi estatisticamente diferente entre os três grupos de lesões ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 19) e secundário à diferença entre as pacientes com carcinoma invasivo em relação àquelas apresentando lesões de NIV III ( $p < 0,0001$ ) e de carcinoma superficialmente invasivo ( $p = 0,05$ ).

As idades médias das pacientes contendo ou não o papilomavírus humanos foram semelhantes entre os três grupos.

A detecção do vírus através das técnicas de imuno-histoquímica ou hibridização molecular *in situ* ocorreu em 29 do total de 102 casos analisados (28,4%) e correspondiam a 22 lesões de NIV III (75,9%), três carcinomas superficialmente invasivos (10,3%) e quatro carcinomas invasivos (13,8%). Os dados mais importantes estão relacionados na tabela abaixo (Tabela 28).

**TABELA 28**

**Achados mais importantes relacionados à detecção dos papilomavírus humanos, através da imuno-histoquímica ou da hibridização molecular *in situ*, somando-se os três grupos de pacientes**

|                                     | HPV presente (n=29) | HPV ausente (n=73) | Valor de p |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------|------------|
| Idade média (anos)                  | 42                  | 66,5               | 0,0001     |
| Lesões multicêntricas               | 14 (48,3%)          | 9 (12,3%)          | 0,0002     |
| Lesões multifocais                  | 9 (31%)             | 22 (30,1%)         | 0,03       |
| Condiloma associado                 | 13 (44,8%)          | 9 (12,3%)          | 0,0007     |
| Alterações coilocitóticas presentes | 23 (79,3%)          | 45 (61,6%)         | 0,09       |
| p53 positiva                        | 9 (31%)             | 37 (50,7%)         | 0,07       |

HPV: papilomavírus humanos

Observamos forte correlação entre a presença do HPV com idade média mais jovem das pacientes, com a presença de lesões multicêntricas e multifocais e com lesão de condiloma associado.

Mostrou tendência estatística em relação à presença de alterações coilocitóticas e com o resultado da pesquisa da proteína p53, embora o grau de coilocitose estivesse associado à detecção do vírus ( $p = 0,003$ ).

Através da análise de regressão logística, notamos que a presença de idade mais jovem ( $p=0,0001$ ), de condiloma ( $p=0,003$ ) e de lesões multicêntricas ( $p=0,007$ ) continuaram associadas à detecção do papilomavírus humanos.

#### 4.13. DETECÇÃO DA PROTEÍNA P53 ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Podemos observar na Tabela 19 que a distribuição do número de casos positivos e negativos para a pesquisa da proteína p53 foram diferentes entre os três grupos de pacientes, assim como a intensidade da reação positiva ( $p=0,0007$ ), secundária à diferença entre as pacientes contendo lesão de NIV III quando comparadas com os grupos de carcinoma superficialmente invasivo ( $p=0,01$ ) e de carcinoma invasivo ( $p=0,0003$ ).

Também notamos diferença entre as idades médias nos três grupos de pacientes com resultado negativo ( $p=0,0003$ ) e positivo ( $p=0,003$ ) para a proteína p53, secundária à diferença entre as idades médias do grupo com NIV III e carcinoma escamoso invasivo.

A proteína p53 foi detectada em 46 casos (45,1%), correspondendo a oito lesões de NIV III (17,4%), seis (13%) carcinomas superficialmente invasivos e 32 (69,6%) carcinomas invasivos. Os dados mais importantes analisados em relação ao resultado da pesquisa para a proteína p53, estão relacionados na tabela abaixo (Tabela 29).

**TABELA 29**  
Relação entre a presença da proteína p53 e as outras variáveis analisadas nos três grupos de pacientes

|                                     | p53 positiva (46 casos) | p53 negativa (56 casos) | Valor de p  |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|
| Idade média (anos)                  | 62,4                    | 56,9                    | 0,1         |
| Lesões multicêntricas               | 6 (13%)                 | 17 (30,4%)              | <b>0,04</b> |
| Lesões multifocais                  | 15 (32,6%)              | 16 (28,6%)              | 0,8         |
| Condiloma associado                 | 8 (17,4%)               | 14 (25%)                | 0,3         |
| Alterações coilocitóticas presentes | 36 (78,3%)              | 32 (57,1%)              | <b>0,03</b> |
| IHQ-HPV positiva                    | 6 (13%)                 | 13 (23,2%)              | 0,2         |
| HIS-HPV positiva                    | 6 (13%)                 | 15 (26,8%)              | 0,09        |
| Presença do HPV (IHQ e/ou HIS)      | 9 (19,6%)               | 20 (35,7%)              | 0,07        |

IHQ = imuno-histoquímica

HIS = hibridização molecular *in situ*

HPV = papilomavírus humanos

Reação positiva estava associada à presença de lesões multicêntricas e de alterações coilocitóticas e mostrou tendência estatística ( $p=0,07$ ) com o grau de coilocitose onde, pacientes contendo alterações coilocitóticas acentuadas apresentavam maior tendência a ter resultado negativo para a pesquisa da proteína p53.

Também mostrou tendência estatística com a detecção do DNA viral e do papilomavírus humano através de um dos métodos de detecção do vírus (Tabela 30).

**TABELA 30**  
**Relação entre a presença da proteína p53 e a detecção dos papilomavírus humanos associando-se os três grupos de pacientes**

|                 | p53 negativa               | p53 positiva      | Total             |
|-----------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| HPV negativo    | 36 (35,3%)                 | 37 (36,3%)        | 73 (71,6%)        |
| HPV positivo    | 20 (19,6%)                 | 9 (8,8%)          | 29 (28,4%)        |
| <b>Total</b>    | <b>56 (54,9%)</b>          | <b>46 (45,1%)</b> | <b>102 (100%)</b> |
| $p(x^2) = 0,07$ | HPV: papilomavírus humanos |                   |                   |

Embora a diferença entre as idades médias das pacientes com resultado positivo ou negativo não fosse significativa, ao agruparmos os casos negativos e os positivos de intensidade leve e compararmos com os positivos de grau moderado e intenso, notamos significância estatística ( $p=0,006$ ), com as pacientes apresentando idades médias de 56,4 (desvio padrão de 19) e 67,5 anos (desvio padrão de 14,3), respectivamente.

Através da análise de regressão logística, observamos que continuou significativa a associação entre a presença de alterações coilocitóticas com a detecção da proteína p53 ( $p=0,01$ ) e a presença de lesões multicêntricas com a sua ausência ( $p=0,02$ ).

## V. DISCUSSÃO

---

### 1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III

#### 1.1. INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA

Estudos mostram um aumento no diagnóstico das lesões intraepiteliais neoplásicas vulvares grau III (NIV III) entre as décadas de 70 e 90, dobrando nos últimos 20 anos de 1,1 para 2,1 por 100.000 mulheres (STURGEON et al., 1992; HOMESLEY, 1995; KAUFMAN, 1995; EDWARDS et al., 1996; KÜPPERS et al., 1997). A maioria dos autores observou também alteração no seu padrão epidemiológico, com uma maior incidência predominantemente nos grupos etários mais jovens, ao redor da terceira década, enquanto que anteriormente acometia mais as pacientes entre a quinta e sexta década de vida (CRUM et al., 1984; BUSCEMA et al., 1988; HØRDING et al., 1991; JONES & ROWAN, 1994; KAUFMAN, 1995; van BEURDEN et al., 1995). Entretanto, JUNGE et al. (1997) não notaram diferença na incidência das lesões de NIV III e nas idades médias das pacientes entre os períodos de 1968-1980 e 1980-1990. Também HEROD et al. (1996a) não identificaram disparidades nas idades médias no intervalo estudado, entre 1978 e 1992.

Muitos autores correlacionam o aumento no diagnóstico das lesões de NIV III ao crescimento do número de mulheres infectadas por papilomavírus humanos na população geral (WOODRUFF, 1985; JONES et al., 1990; HØRDING et al., 1991; HOMESLEY, 1995; HEROD et al., 1996a). Entretanto, HEROD et al. (1996) interrogam se o aumento na incidência da infecção por HPV é verdadeira ou secundária a um maior reconhecimento das alterações citológicas e histológicas associadas ao vírus, ou a mudanças nos critérios histopatológicos empregados na definição destas lesões virais.

IVERSEN & TRETALI (1998) referem que a infecção viral é mais freqüente nas pacientes jovens e, portanto, que o aumento na incidência do NIV III deveria ocorrer predominantemente neste grupo de mulheres. Entretanto, eles notaram um aumento do diagnóstico de NIV III em todos os grupos etários do período estudado, entre 1973 e 1992 e sugerem que talvez a infecção pelo vírus não seja a razão principal deste crescimento, mais provavelmente decorrente de um aperfeiçoamento dos procedimentos diagnósticos.

Identificamos 38 lesões de NIV III, 13 (34,2%) diagnosticadas no período de 1983 a 1989 e 25 (65,8%) entre 1990 e 1995, significante do ponto de vista estatístico ( $p < 0,0001$ ); porém, não encontramos diferença entre as idades médias das pacientes.

Embora a análise estatística de alguns parâmetros tenha sido prejudicada devido aos poucos casos diagnosticados no nosso serviço, podemos observar na tabela abaixo (Tabela 31) que esta é uma lesão realmente pouco freqüente e está de acordo com a maioria dos trabalhos isolados, os quais mostram uma incidência de 2,4 a 5 casos/ano. Os estudos com casuística maior são geralmente compilações de vários casos provenientes de diferentes centros de referências.

**TABELA 31**

**Relação do número de casos de NIV III e o período levantado em diferentes trabalhos da literatura**

| Número total de casos | Período (anos) | Número de casos/ano | Autores                     |
|-----------------------|----------------|---------------------|-----------------------------|
| <b>38 (a)</b>         | <b>13</b>      | <b>2,9</b>          |                             |
| 27                    | 8              | 3,4                 | BARBERO et al., 1990        |
| 32                    | 11             | 2,9                 | BARBERO et al., 1993        |
| 50                    | 4              | 12,5                | HAEFNER et al., 1995        |
| 92 (b)                | 15             | 6,1                 | HEROD et al., 1996a         |
| 19                    | 4              | 4,7                 | HØRDING et al., 1991        |
| 73 (c)                | 24             | 3,0                 | HØRDING et al., 1995        |
| 32                    | 12             | 2,7                 | HUSSEINZADEH et al., 1989   |
| 169 (d)               | 7              | 24,1                | ISSVD, 1996                 |
| 303 (e)               | 10             | 30,3                | IVERSEN & TRETLI, 1998      |
| 113                   | 33             | 3,4                 | JONES & ROWAN, 1994         |
| 72                    | 23             | 3,1                 | JUNGE et al., 1995          |
| 55                    | 23             | 2,4                 | JUNGE et al., 1997          |
| 59                    | 6              | 9,8                 | KÜPPERS et al., 1997        |
| 30                    | 25             | 1,2                 | PARK et al., 1991a          |
| 50                    | 10             | 5,0                 | POWELL Jr. et al., 1986     |
| 28                    | 18             | 1,6                 | RUEDA-LEVERONE et al., 1987 |
| 249                   | 12             | 20,7                | SHERMAN et al., 1994        |
| 54                    | 2,5            | 21,6                | TRIMBLE et al., 1996        |
| 48                    | 10             | 4,8                 | van BEURDEN et al., 1995    |
| 47                    | 2              | 23,5                | WOODRUFF, 1991              |

(a) dados referentes a este trabalho de tese

(b) pacientes provenientes de duas clínicas

(c) casos levantados em dois hospitais universitários

(d) ISSVD: ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE – casos coletados em 13 instituições em um período de três a 11 anos, e o número de pacientes variando entre zero e 91. Em média o número de casos por ano diagnosticados em cada instituição foi respectivamente: 8,3, 3,1, 1,2, 2,7, 0,8, 1,2, 0,0 e 2,0.

(e) retirados dos arquivos do Registro de Câncer da Noruega

A idade das pacientes estava entre 15 e 82 anos, com média de 47,5 anos, sendo que 45,9% delas tinham 40 anos ou menos e 29,7%, mais de 60 anos. Os nossos achados são semelhantes aos relatados na maioria dos trabalhos, onde a idade média situa-se entre 38 e 47 anos e cerca de 50% das pacientes têm menos de 40 anos (BUCKLEY et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986; HUSSEINZADEH, NEWMAN, WESSELER, 1989; SHERMAN et al., 1994; van BEURDEN et al., 1995; HEROD et al., 1996a). Entretanto, alguns autores encontraram idade média mais alta, entre 52 e 54 anos (BARBERO et al., 1990, 1993; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996), podendo indicar apenas que a população da área geográfica estudada apresenta idade média maior.

## **1.2. ETNIA**

Poucos trabalhos relatam a etnia das pacientes com lesão de NIV III, sendo que 80 a 90% delas são caucasóides (POWELL Jr. et al., 1986; BUSCEMA et al., 1988; KAUFMAN, 1995; EDWARDS et al., 1996). EDWARDS et al. (1996) referem que a etnia não é um fator de risco para o desenvolvimento do NIV, cuja incidência encontrada foi semelhante entre a população caucasóide e afro-descendente. No nosso estudo 75% eram caucasóides. Entretanto, este achado pode ser resultante da amostragem populacional da área geográfica de origem das nossas pacientes, constituída predominantemente por mulheres caucasóides.

## **1.3. HISTÓRIA DE OUTRAS LESÕES ASSOCIADAS NO TRATO GENITAL INFERIOR**

Encontramos outras patologias associadas no trato genital inferior em 36,8% dos casos, predominantemente no colo uterino (78,6%), sendo que três (27,3%) também apresentavam lesões na vagina. Não estava relacionado a nenhuma das variáveis estudadas como: a idade das pacientes, a presença de condiloma, alterações coilocitóticas ou lesões multifocais, com a variante histológica da neoplasia intraepitelial, a detecção do vírus e da proteína p53.

A maioria dos trabalhos, à semelhança dos nossos achados, mostra que pacientes contendo NIV III possuem lesões multicêntricas em 22 a 77% dos casos, com

média ao redor de 50%, predominantemente no colo uterino (81 a 92%) e com frequência menor na vagina (7 a 13%). Outros locais mais raramente envolvidos são: ovário, endométrio, mama, pele, pâncreas, intestino grosso, etc (BORNSTEIN et al., 1988a; HUSSEINZADEH et al., 1989; PILOTTI et al., 1989; JONES et al., 1990; HEROD et al., 1996a; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996; KÜPPERS et al., 1997; van BEURDEN et al., 1998).

Embora concordante com alguns trabalhos, a nossa incidência mais baixa de lesões multicêntricas em relação a outros pode ser explicada pela ausência de multicentricidade, ou que esta informação não foi relatada durante o preenchimento das requisições de exame anatomopatológico.

O risco relativo das pacientes contendo NIV III desenvolverem outra neoplasia no trato genital inferior é de 29,8 sendo assim, obrigatória a investigação do colo uterino, vagina, períneo e região perianal, nestas mulheres (JONES & ROWAN, 1994; van BEURDEN et al., 1998).

Alguns autores observaram correlação entre multicentricidade e a presença de lesões multifocais e recorrentes, com pacientes de grupos etários mais jovens e com a detecção do papilomavírus humano, sugerindo que este vírus tenha um papel como agente etiológico pelo menos neste grupo de pacientes (BORNSTEIN et al., 1988a; TWIGGS et al., 1988; van BEURDEN et al., 1995, 1998; HEROD et al., 1996a; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996). Entretanto, outros trabalhos não conseguiram, assim como nós, demonstrar esta associação, indicando que a presença de outras neoplasias no trato genital não influencia o padrão de desenvolvimento destas lesões (HØRDING et al., 1991; PARK et al., 1991a).

BORNSTEIN et al. (1988a) notaram que as lesões multicêntricas estavam associadas aos grupos etários mais jovens, sugerindo que este grupo de pacientes seja mais susceptível à ação dos fatores causadores da multicentricidade, ou de que a lesão de NIV III pode se originar de dois processos distintos, onde as pacientes mais jovens estão sujeitas à ação de carcinógenos comuns e as mais velhas, aos processos específicos originados na região vulvar.

#### 1.4. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS LESÕES

As lesões apresentam aspecto macroscópico variado e inespecífico, muitas vezes associadas, embora sejam mais freqüentemente, em cerca de 65% dos casos, elevadas, rugosas e raramente, ulceradas (3-6%). Outros aspectos que podem ser observados ao exame físico são: alterações inflamatórias, eritema, hipo- ou hiperpigmentação, áreas de leucoplasia ou aceto-brancas (BUCKLEY et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986; HUSSEINZADEH et al., 1989; HEROD et al., 1996a).

Encontramos, em concordância com a literatura, 54,2% de lesões elevadas e rugosas e 4,2%, ulceradas.

#### 1.5. FOCALIDADE DAS LESÕES

Encontramos nos nossos casos o predomínio de lesões multifocais (72,2%) e não estavam relacionados a nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, devemos ressaltar que apenas 18 dentre os 38 casos do estudo eram passíveis de avaliação quanto a focalidade, resultando em uma amostragem muito pequena para uma análise estatística adequada.

Na literatura a incidência de lesões multifocais varia de 27,9% a 93% (POWELL Jr. et al., 1986; HUSSEINZADEH et al., 1989; van BEURDEN et al., 1995, 1998; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996; JUNGE et al., 1997).

Alguns autores associam lesões multifocais a pacientes mais jovens, à presença de lesões multicêntricas e à detecção do HPV (BORNSTEIN et al., 1988a; TWIGGS et al., 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989; HOMESLEY, 1995; van BEURDEN et al., 1995, 1998; HEROD et al., 1996a), enquanto outros não conseguiram demonstrar esta relação.

POWELL Jr. et al. (1986) observaram que a distribuição do número de pacientes com lesões multifocais era semelhante ao do grupo com lesões unifocais, mas que das pacientes com lesões multifocais 42% tinham menos e apenas 8% mais de 50 anos.

JUNGE et al. (1997) notaram que as pacientes com lesões multifocais eram mais jovens (39 anos) do que aquelas com lesões únicas (53,5 anos), a maioria com idade

inferior a 50 anos, embora esta diferença não tenha sido significativa do ponto de vista estatístico.

van BEURDEN et al. (1995) não conseguiram correlacionar a variante histológica do NIV III com a focalidade das lesões.

JONES et al. (1990) mostraram que 50% das lesões multifocais eram HPV positivas e 50% negativas.

## **1.6. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES**

Os locais envolvidos pelas lesões de NIV III variam entre os diferentes trabalhos. Enquanto EDWARDS et al. (1996) observaram maior número de lesões nos pequenos lábios, no estudo de POWELL Jr. et al. (1986) elas estavam localizadas predominantemente nos grandes lábios.

O envolvimento das regiões perineal e perianal varia de 3 a 40% (POWELL Jr. et al., 1986; HUSSEINZADEH et al., 1989; EDWARDS et al., 1996) e estavam envolvidas em 4% e 2% dos nossos casos, respectivamente.

## **1.7. VARIANTES HISTOLÓGICAS**

Na literatura muitos autores consideram que o mais freqüente é a associação entre as variantes histológicas, identificada em 35 a 84% dos casos (HAEFNER et al., 1995; JUNGE et al., 1995; van BEURDEN et al., 1995; KOHLBERGER et al., 1998) e em alguns trabalhos chegando a 100% das lesões (HØRDING et al., 1995; JUNGE et al., 1997). A presença de diferentes clones celulares com potenciais de crescimento distintos, sob a influência do HPV, parece ser a responsável pela identificação de padrões morfológicos heterogêneos em áreas vizinhas e este aspecto variado da lesão talvez reflita mais o estágio da infecção viral do que o tipo de HPV presente (JUNGE et al., 1995).

Nós identificamos o padrão misto em apenas três casos (7,9%) e eles foram classificados de acordo com o tipo predominante (KURMAN et al., 1992; COSTA et al., 1995; KAUFMAN, 1995). Esta baixa incidência pode ser conseqüência da análise

histológica ter sido realizada na maioria dos casos (57,9%), em material proveniente de biópsias contendo pequena amostragem da lesão para avaliação. Segundo JUNGE et al. (1995) as formas puras são mais freqüentemente encontradas em lesões pequenas e iniciais.

Nos nossos casos, 92,1% correspondiam à variante bowenóide e 7,9% ao tipo basalóide. Na literatura, a incidência da variante bowenóide varia entre 28,6% e 91,3%, com média ao redor de 50% e do padrão basalóide entre 8,7% e 71,4%, com média de 40%. Em alguns trabalhos, as variantes apresentavam distribuição semelhante (POWELL Jr. et al., 1986; HØRDING et al., 1995; JUNGE et al., 1997), em outros havia o predomínio da variante bowenóide, presente em 66,7% a 91,3% dos casos (PARK et al., 1991a; JUNGE et al., 1995; KAGIE et al., 1997a), ou do padrão basalóide (KOHLBERGER et al., 1998). Os nossos achados estão de acordo com o de JUNGE et al. (1995), onde eles observaram que 91,3% eram da variante bowenóide e 8,7% do tipo basalóide.

Não conseguimos correlacionar o tipo histológico com nenhuma das variáveis analisadas, embora fossem apenas três os casos da variante basalóide. Entretanto, pudemos observar que nenhum dos casos de padrão basalóide apresentava lesão de condiloma associado e apenas um, tinha alterações coilocitóticas e de intensidade leve, todos foram negativos para a detecção do antígeno viral e da proteína p53 e apenas um foi positivo para o DNA viral. Estes achados estão em concordância com os de HAEFNER et al. (1995), JUNGE et al. (1995) e de van BEURDEN et al. (1995), pois eles também não encontraram relação com a idade média das pacientes, embora no trabalho de HAEFNER et al. (1995) mostrasse tendência estatística para a presença do vírus e de lesões multifocais.

No estudo de KAGIE et al. (1997a) a variante histológica não estava associada à detecção da proteína p53. Outros correlacionam o padrão bowenóide com a presença do HPV e de alterações coilocitóticas (PARK et al., 1991a; JUNGE et al., 1995; van BEURDEN et al., 1995).

O padrão diferenciado não estava presente nos nossos casos, embora o seu diagnóstico seja difícil e controvertido e a sua incidência muito baixa na literatura, ao redor de 2 a 4%. Geralmente está associado a pacientes mais idosas, ao líquen escleroso, ao carcinoma escamoso invasivo e à ausência do papilomavírus humano (HAEFNER et al., 1995; JUNGE et al., 1995; van BEURDEN et al., 1995).

É recomendado que se continue a separar estes tipos histológicos para que sejam realizados mais estudos para verificar se elas possuem diferentes características clínicas e epidemiológicas.

### 1.8. SINAIS HISTOLÓGICOS SUGESTIVOS DE INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANOS

Alterações coilocitóticas estavam presentes em 29 casos (76,3%), com distribuição semelhante entre os diferentes graus de intensidade, sendo que 69,0% eram de grau moderado ou intenso. Não encontramos relação com nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, observamos que 41,4% das lesões contendo alterações coilocitóticas eram multifocais e apenas 11,1% das desprovidas de coilocitose. Dos três casos da variante basalóide, duas não apresentavam coilocitose e uma era de intensidade leve. Embora a presença de alterações coilocitóticas não estivesse associada à detecção do antígeno ou DNA viral, a intensidade da coilocitose mostrou correlação com a positividade da reação pelas duas técnicas e também, com a intensidade da reação da hibridização *in situ*.

Na literatura, a presença de sinais histológicos sugestivos de infecção viral varia entre 30% e 83%, com média de 57% (RUEDA-LEVERONE et al., 1987; BUSCEMA et al., 1988; BARBERO et al., 1990; JONES et al., 1990; PARK et al., 1991a; WALTERS et al., 1993; van BEURDEN et al., 1995; HEROD et al., 1996a; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996).

Embora CRUM et al. (1984) e VOOG (1996) enfatizem que a presença e o grau das alterações coilocitóticas na região vulvar seja menos freqüente do que no colo uterino, talvez secundário à origem distinta de ambos os epitélios escamosos, respectivamente, primário e metaplásico, detectamos coilocitose de grau moderado ou intenso em 69% dos casos, correspondendo a 52,6% do total de 38 pacientes em estudo e van BEURDEN et al. (1995), em 54% das lesões.

Diferente da literatura, onde a presença de alterações coilocitóticas está associada a pacientes mais jovens (CRUM et al., 1984; HAEFNER et al., 1995; HEROD et al., 1996a; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996), não encontramos esta diferença.

Os autores do ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE (1996) notaram que os sinais histológicos de infecção viral eram predominantes nos grupos etários mais jovens, contendo lesões multicêntricas, e sugerem que as lesões de NIV III associadas ao HPV representam uma entidade distinta.

Alguns trabalhos não conseguiram correlacionar a presença de coilocitose com a detecção do HPV (BUSCEMA et al., 1988; HAEFNER et al., 1995; van BEURDEN et al., 1995), assim como nós. No estudo de BUSCEMA et al. (1988), o índice de detecção viral foi semelhante entre os grupos contendo ou não coilocitose e também não estava associado com o tipo do vírus presente na lesão.

Diferentemente, RUEDA-LEVERONE et al. (1987) e BARBERO et al. (1990) notaram que todos os casos positivos para o HPV tinham alterações coilocitóticas. No trabalho de JONES et al. (1990), a coilocitose estava presente em 93,3% das lesões contendo o DNA viral e apresentava distribuição semelhante naquelas onde o vírus não foi detectado. No nosso estudo, a presença e a intensidade das alterações coilocitóticas era semelhante no grupo contendo o vírus e naquele onde o HPV não foi identificado.

Uma questão que deve ser levantada é do por que, mesmo em lesões com coilocitose acentuada, o vírus não é detectado? Seria esta alteração sempre representativa de infecção viral, ou existem outras explicações para este fenômeno como, por exemplo, um processo celular degenerativo ou reacional à inflamação? (OKAGAKI, 1984; HUSSEINZADEH et al., 1989; WOODRUFF, 1991; VOOG, 1996). Do nosso ponto de vista, os casos de intensidade leve poderiam representar alterações degenerativas ou reacionais e seriam assim confundidas com sinais de infecção viral. Entretanto, esta explicação é pouco provável nas lesões com intensidade moderada e intensa e a ausência de detecção do HPV talvez esteja relacionada com a sensibilidade do método de detecção e será discutido posteriormente com mais detalhe.

### **1.9. ALTERAÇÕES EPITELIAIS ADJACENTES ÀS LESÕES DE NIV III**

Pacientes com lesões de NIV III apresentam condiloma associado, atual ou pregresso, em 15% a 43% dos casos (POWELL Jr. et al., 1986; BUSCEMA et al., 1988; TWIGGS et al., 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989; PRAT, 1991). Identificamos lesão

de condiloma no epitélio adjacente em 42,1% dos casos e hiperplasia escamosa em duas pacientes (5,3%). Apesar da presença de condiloma não estar associada a nenhum dos parâmetros analisados, pudemos observar alguns pontos interessantes:

- 46% das pacientes contendo lesões multifocais e 20% unifocais tinham condiloma associado;
- nenhuma com a variante basalóide apresentava condiloma;
- 43,7% das lesões contendo condiloma e 26,4% com epitélio normal ou hiperplásico, foram positivas para o antígeno do HPV. Além disso, a intensidade da reação estava associada ao tipo de alteração histológica presente no epitélio adjacente;
- a presença de condiloma mostrou tendência estatística ( $p=0,09$ ) com a detecção do DNA viral, com reação positiva em 58,8% dos casos.

São poucos os trabalhos que relacionam NIV III com as lesões distróficas, presentes em 12 a 40% dos casos (média de 30%) e representadas predominantemente pela hiperplasia escamosa, entre 16,7 e 96% (média de 51,7%) e menos freqüentemente, ao redor de 4 a 27%, pelo líquen escleroso (CRUM & BURKETT, 1989; BARBERO et al., 1990; ZARCONE et al., 1991; HAEFNER et al., 1995; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996).

ZARCONE et al. (1991), estudando as lesões distróficas vulvares, observaram a presença de neoplasia intraepitelial vulvar grau III em 2,4% dos casos de hiperplasia escamosa e em 3% das lesões de líquen escleroso. Dentre os seis casos de NIV III avaliados, uma paciente (16,7%) apresentava hiperplasia escamosa e uma (16,7%), líquen escleroso. Eles notaram que os diferentes graus de atipias epiteliais estavam associados à distrofia em geral em 14,7% dos casos e à fase hiperplásica em 41,7%, localizadas nas áreas de neoplasia ou nas regiões adjacentes. Estes autores concluem que a possibilidade da hiperplasia escamosa evoluir para displasia existe e que fenômenos irritativos locais crônicos prazo podem ser importantes no desenvolvimento do carcinoma vulvar, sendo o HPV um destes possíveis fatores envolvidos na indução de hiperplasia atípica.

WOODRUFF (1991) e o ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE (1996), aventam a hipótese de que a hiperplasia escamosa possa ser apenas uma resposta

inespecífica do epitélio a diferentes estímulos irritativos atuantes na região vulvar. Embora fossem raros os casos de hiperplasia escamosa no nosso trabalho, concordamos com estes autores. Entretanto, não é possível concluir este nosso ponto de vista e os trabalhos na literatura são muito escassos, com pequeno número de casos estudados.

A presença de lesões distróficas, particularmente o líquen escleroso, está associada à pacientes mais idosas e à neoplasia intraepitelial vulvar de baixo grau (BARBERO et al., 1990; HAEFNER et al., 1995; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996). Embora só tivéssemos dois casos de distrofia e representados apenas pela hiperplasia escamosa, não observamos diferença entre as idades médias das pacientes.

Como nos estudos de RIDLEY (1994), HØRDING et al. (1995) e de JUNGE et al. (1995, 1997), também não encontramos nenhum caso de líquen escleroso, mas quando presente, está normalmente associada à variante histológica diferenciada (RIDLEY, 1994), padrão ausente no nosso estudo. JUNGE et al. (1997) consideram o líquen e a displasia epitelial como entidades distintas e não relacionadas.

HAEFNER et al. (1995) observaram que algumas pacientes contendo líquen escleroso associado a NIV III também apresentavam o DNA do HPV nas lesões, sendo que todas eram da variante bowenóide. Entretanto, o vírus não foi detectado nas áreas de líquen, mostrando que ambos os fatores de risco podem estar associados a uma mesma neoplasia e que a presença de um não exclui o outro.

#### **1.10. EXTENSÃO PARA OS ANEXOS CUTÂNEOS**

Poucos trabalhos avaliam a extensão da neoplasia intraepitelial vulvar grau III para os anexos cutâneos e na maioria dos estudos, são discutidos e relacionados aos diferentes métodos de tratamento (JONES & ROWAN, 1994; KAUFMAN, 1995; HEROD et al., 1996a). Entretanto, PRAT (1991) notou extensão para os anexos cutâneos em 55% das lesões de NIV III e no nosso estudo, estava presente em 37,5% dos casos, predominantemente para os folículos pilosos (88,9%).

### 1.11. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Detectamos o antígeno do HPV em 34,2% dos casos, de caráter focal, nas camadas mais superiores do epitélio, predominantemente em células coilocitóticas, à semelhança dos relatos na literatura (ROMAN & FIFE, 1989) e não mostravam correlação com nenhuma das variáveis estudadas. Apesar disso, pudemos notar alguns dados interessantes:

- todos os casos onde o antígeno viral estava presente com intensidade moderada e intensa, também mostravam positividade para o DNA do HPV. Os de intensidade leve apresentavam distribuição semelhante de casos positivos e negativos através da hibridização molecular *in situ*;
- embora a detecção do antígeno viral não estivesse relacionada com a presença ou ausência de alterações coilocitóticas, havia associação com a sua intensidade;
- a presença de condiloma não influenciou o resultado positivo ou negativo, mas estava associada à intensidade da reação positiva, embora PILOTTI et al. (1989) tenham encontrado maior índice de positividade no grupo de pacientes contendo lesão de condiloma;
- a detecção do capsídeo não estava relacionada à presença do DNA viral, embora mostrasse correlação com o tipo de HPV, onde 75% dos casos contendo os tipos 16/18 foram negativos e todos com infecção mista, assim como o único caso com o tipo 6/11, positivos.

Como em nosso trabalho, PILOTTI et al. (1989) não notaram diferença entre as idades médias das pacientes contendo ou não o antígeno viral. Entretanto, todas com resultado positivo tinham lesões multicêntricas, ao contrário dos nossos achados e de BORNSTEIN et al. (1988a), com distribuição semelhante entre os dois grupos.

Atualmente a técnica da imuno-histoquímica não é mais utilizada na pesquisa da presença do HPV por ser um método pouco sensível, principalmente nas lesões intraepiteliais neoplásicas de alto grau e invasivas, pois necessita de diferenciação celular (maturação) para que ocorra a expressão dos genes virais tardios responsáveis pela formação do capsídeo viral, o qual é detectado através desta técnica. Entretanto, o seu índice de detecção é baixo mesmo em lesões contendo nível elevado de antígeno, com

positividade de 50 a 64% nas lesões de condiloma (OKAGAKI, 1984; WILBUR, REICHMAN, STOLER, 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989; PILOTTI et al., 1989; ROMAN & FIFE, 1989; PRAT, 1991; SOLER et al., 1992). Em relação às lesões de NIV III, os resultados variam entre os diferentes estudos, desde a ausência de detecção até 75% de positividade (CRUM et al., 1982b; POWELL Jr. et al., 1986; HUSSEINZADEH et al., 1989; PILOTTI et al., 1989; COSTA et al., 1990). OKAGAKI (1984) detectou o antígeno viral em 4,8% dos casos e PRAT (1991) em menos de 10%, enquanto RUEDA-LEVERONE et al. (1987) encontraram sinal positivo em 23,1%, todos com alterações citológicas sugestivas de infecção viral e BORNSTEIN et al. (1988a) em 21% das lesões.

Na avaliação das lâminas deve ser levado em consideração que vários fatores podem influenciar o resultado da reação e estão relacionados ao:

**a) espécime** (ROMAN & FIFE, 1989)

- o tamanho do espécime, onde a infecção viral focal pode não estar representada em fragmentos muito pequenos;
- variação do número de partículas virais nos diferentes segmentos do epitélio;
- o estado funcional das células, onde as proteínas podem ser rapidamente liberadas, ou temporariamente não sintetizadas;
- expressão periódica do vírus maduro na lesão.

**b) tipo do fixador e tempo de fixação**

O antígeno viral pode ser destruído ou modificado durante o processamento do tecido (ROMAN & FIFE, 1989).

A formalina altera a estrutura do DNA celular através de interações com as pontes de hidrogênio. Entretanto, podem ser empregados métodos de recuperação antigênica para minimizar estes efeitos como a digestão enzimática e a utilização de temperaturas elevadas (KARLSEN et al., 1994; PILERI et al., 1997).

RESNICK et al. (1995) e PILERI et al. (1997) observaram que o uso de altas temperaturas é mais eficaz do que a digestão proteica na redução dos efeitos induzidos pela fixação prolongada do espécime.

Como os espécimes do nosso trabalho haviam sido fixados em formalina 10% e sem controle apropriado do tempo de fixação, optamos pela elevação da temperatura através da utilização do forno de microondas, nas lâminas banhadas com tampão citrato.

PILERI et al. (1997), comparando diferentes fluidos notaram que o EDTA foi o mais eficaz, seguido do Tris-HCl. Embora o tampão citrato seja o mais utilizado nas pesquisas, ele foi o que apresentou menor número de células coradas e com intensidade mais fraca, independentemente do tipo de processamento do tecido, do método de aquecimento e da técnica de imuno-histoquímica empregada.

*c) fatores técnicos* (HSU et al., 1981; ROMAN & FIFE, 1989)

- concentração do anticorpo primário;
- método imuno-histoquímico: a técnica do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) é mais sensível do que o da peroxidase-anti-peroxidase (PAP), pois a primeira contém moléculas menores o que facilita a sua penetração e difusão no interior da célula, além de apresentar quatro sítios de ligação para a biotina aumentando assim, a intensidade da coloração.

Desta exposição pode-se concluir que na ausência de detecção do antígeno viral, não é possível afirmar que a infecção por HPV não existe, pois esta técnica é pouco sensível e sujeita à interferência de inúmeros fatores.

## **1.12. DETECÇÃO DO DNA VIRAL ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU***

O DNA do HPV foi detectado em 17 (44,7%) dos nossos casos, com a idade das pacientes variando entre 15 e 75 anos. O tipo mais freqüentemente encontrado foi o 16/18, presente em 16 (94,1%), quatro deles também apresentando outros tipos associados na mesma lesão. Apenas um caso foi positivo para o tipo 6/11 isoladamente.

Em concordância com a literatura, observamos que o sinal positivo estava localizado nas camadas mais superficiais do epitélio, onde existe um maior número de cópias virais, em células contendo ou não alterações coilocitóticas, mostrando assim que

não é possível através do exame histológico, predizer quais serão as lesões que terão resultado positivo ou negativo (PARK et al., 1991a; JUNGE et al., 1995, 1997; LIE et al., 1997). Como PARK et al. (1991a) e LIE et al. (1997) o DNA viral estava ausente no epitélio adjacente à lesão de NIV III e desprovido de condiloma.

Na região vulvar o HPV é detectado em 20 a 100% das lesões de NIV III, dependendo da sensibilidade do método empregado, sendo que através da hibridização molecular *in situ*, o DNA viral está presente em 40 a 60% dos casos, valor próximo ao encontrado no nosso trabalho (OKAGAKI, 1984; HUSSEINZADEH et al., 1989; JONES et al., 1990; PARK et al., 1991a; JUNGE et al., 1995, 1997; van BEURDEN et al., 1995). Enquanto alguns autores (REID et al., 1987; TWIGGS et al., 1988; PRAT, 1991) detectaram o DNA viral em 80% das lesões de NIV III pelo método de Southern blot, BARBERO et al. (1990) utilizando esta mesma técnica identificaram o vírus em apenas 20% dos casos.

À semelhança das neoplasias intraepiteliais cervicais grau III, o tipo mais freqüentemente identificado no NIV III, como o encontrado por nós, é o HPV 16, presente em cerca de 67 a 100% dos casos (REID et al., 1987; TWIGGS et al., 1988; PILOTTI et al., 1989; JONES et al., 1990; PARK et al., 1991a; HØRDING et al., 1995; JUNGE et al., 1995; van BEURDEN et al., 1995, 1998). Outros tipos também identificados na região vulvar são o 6/11 e o 31/33, presentes em 3 e 14% dos casos, respectivamente (BORNSTEIN et al., 1988a; BUSCEMA et al., 1988; TWIGGS et al., 1988; PILOTTI et al., 1989; NUOVO et al., 1991a; HØRDING et al., 1995; JUNGE et al., 1995, 1997).

Na nossa casuística, 23,5% das lesões apresentava mais de um tipo de HPV e está de acordo com os trabalhos de BECKMANN et al. (1991) e de van BEURDEN et al. (1998), os quais observaram a presença de infecção múltipla em 22% e 31% dos casos, respectivamente. BECKMANN et al. (1991) consideram que as infecções múltiplas ocorrem mais na região vulvar do que no colo uterino, presente neste último em 5% dos casos, embora NUOVO et al. (1991a) tenham identificado infecção por múltiplos tipos em 2,4% dos casos, com distribuição semelhante entre as pacientes contendo neoplasia intraepitelial cervical e vulvar de alto grau. No colo uterino, em especial no NIC III, este índice varia entre dois e 71%, estando a maioria entre 10 e 20% (NUOVO et al., 1991a; LIE et al., 1997; SONNEX, 1998). Entretanto, alguns autores encontraram uma incidência

menor na vulva. Enquanto PILOTTI et al. (1989) e HAEFNER et al. (1995) detectaram mais de um tipo do HPV em 10% dos casos, HØRDING et al. (1995) notaram uma incidência de 1,5%. Em outros estudos não havia infecção mista em nenhuma lesão (BUSCEMA et al., 1988; JUNGE et al., 1995, 1997). Estão mais freqüentemente associados os tipos 6 e 16 (PILOTTI et al., 1989; BECKMANN et al., 1991), bem como ao 16/18 e 31/33/35 (LIE et al., 1997). Não existe explicação adequada para esta baixa incidência de infecções mistas. Normalmente quando ocorre infecção por diferentes tipos de HPV, observa-se que o número de cópias de um tipo é maior do que o do outro. Esta observação pode ser resultante de (REID et al., 1987; NUOVO et al., 1991a; JUNGE et al., 1995, 1997):

- inibição da replicação do tipo com menor número de cópias pelo vírus presente em maior quantidade, através de mecanismos competitivos;
- contaminação por HPV localizado no epitélio adjacente;
- baixo número de cópias virais secundário ao estágio da infecção ser inicial ou em fase de regressão.

HERRINGTON et al. (1993), estudando material de arquivo fixado em formalina e embocado em parafina, através das técnicas de hibridização molecular *in situ* e da reação em cadeia da polimerase, notaram que a maioria dos casos onde havia infecção múltipla pela hibridização molecular, na verdade, eram apenas reações cruzadas geradas sob as condições usuais de hibridização e estringência. Estes autores ressaltam que certos segmentos do genoma viral são suficientemente homólogos para que haja reação cruzada como, por exemplo, entre os tipos 6 e 11 e entre o 16 e o 31. Outras explicações para a sua ocorrência além da detecção de tipos distintos das sondas empregadas embora relacionados seriam: reação da sonda com seqüências nucleotídicas do DNA celular, ou os tipos virais não são distinguidos acuradamente através desta técnica, acarretando em dificuldades na interpretação dos padrões de hibridização causados por tipos virais correlatos.

A presença de infecção múltipla de uma lesão pode ser confirmada e a possibilidade de reação cruzada afastada, aumentando-se as condições de estringência do ensaio, utilizando-se controles positivos e negativos e detectando-se os diferentes tipos virais em áreas topográficas distintas (NUOVO et al., 1991a; SOLER et al., 1992; HERRINGTON et al., 1993).

Em concordância com os trabalhos de BORNSTEIN et al. (1988a), BUSCEMA et al. (1988), BECKMANN et al. (1991) e JUNGE et al. (1995), não encontramos relação entre o **tipo do vírus** e a presença de lesões multicêntricas e multifocais, de sinais histológicos sugestivos de infecção viral, com a variante histológica e a idade das pacientes.

Notamos correlação entre a **detecção do DNA viral** e a idade média mais jovem das pacientes, e também com a presença de condiloma. Não estava associado à presença de lesões multicêntricas e multifocais, à variante histológica e à detecção do antígeno viral ou da proteína p53.

A idade média mais jovem das pacientes contendo o DNA do HPV está em concordância com vários trabalhos da literatura (BARBERO et al., 1990; JONES et al., 1990; HØRDING et al., 1991; PARK et al., 1991a), embora alguns autores não tenham observado esta diferença (PILOTTI et al., 1989; HAEFNER et al., 1995; HØRDING et al., 1995; van BEURDEN et al., 1995). HUSSEINZADEH et al. (1989), CRUM (1992), e HIETANEN et al. (1995b) referem que nas lesões de NIV III existe uma relação inversa entre a detecção do vírus e a idade das pacientes. No trabalho de HUSSEINZADEH et al. (1989), 61% das pacientes apresentando o DNA do HPV tinham menos de 40 anos e 89% do grupo negativo eram maiores de 40 anos. No nosso trabalho, a incidência foi de 64,7% e 70%, respectivamente.

No nosso estudo, como no trabalho de PILOTTI et al. (1989), a presença de condiloma estava associada com a detecção do DNA viral, diferentemente de BUSCEMA et al. (1988) que não observaram esta relação.

BUSCEMA et al. (1988) e van BEURDEN et al. (1995) não conseguiram demonstrar, assim como nós, correlação com a presença de sinais histológicos sugestivos de infecção viral. Entretanto, BARBERO et al. (1990), JONES et al. (1990), PARK et al. (1991a) e LIE et al. (1997), observaram maior índice de detecção do vírus em lesões contendo alterações coilocitóticas.

Embora alguns autores relatem que a detecção do vírus é mais alta nas lesões com a variante histológica bowenóide (PARK et al., 1991a; JUNGE et al., 1995, 1997), HØRDING et al. (1995) e van BEURDEN et al. (1995), assim como nós, não conseguiram evidenciar esta associação.

van BEURDEN et al. (1998) detectaram o DNA viral em 100% das lesões multicêntricas através da técnica da reação em cadeia da polimerase. Entretanto, nós, assim como BORNSTEIN et al. (1988a) e HØRDING et al. (1995), não encontramos relação entre a presença do DNA viral e multicentricidade. JUNGE et al. (1995) e van BEURDEN et al. (1995) identificaram o vírus predominantemente nas pacientes contendo lesões multifocais, ao contrário dos nossos achados e de JONES et al. (1990).

Através de uma ou de outra técnica, isto é, exame imuno-histoquímico ou hibridização molecular *in situ*, detectamos o vírus em 57,9% dos casos, sendo que apenas oito (36,4%) foram positivos para ambas concomitantemente. Analisando-se todas as variáveis, apenas a idade média mais jovem das pacientes estava associada à presença do vírus. PILOTTI et al. (1989) encontraram reação positiva por um ou outro método em 83% dos casos e 50% de concordância, índice maior do que o encontrado por nós. Vários fatores interferem no resultado da hibridização molecular *in situ*, explicando a variação encontrada na prevalência da infecção por papilomavírus humano entre os diferentes trabalhos da literatura. Entre eles destacam-se:

**a) variação geográfica da população estudada** (BARBERO et al., 1990)

**b) variabilidade interlaboratorial da metodologia e na interpretação dos resultados** (VUOPALA et al., 1993)

**c) espécime**

- tamanho: biópsias pequenas podem não conter os sinais de infecção viral, presentes focalmente nas áreas adjacentes à região biopsiada. GÓMEZ et al. (1995), correlacionaram o tamanho do espécime com o resultado da reação de hibridização molecular *in situ* em lesões intraepiteliais neoplásicas cervicais de baixo e alto grau e observaram que, no geral, o tamanho mínimo necessário para se obter um resultado eficaz é de cinco milímetros mm e o ideal, mais de nove milímetros. Para as lesões de baixo e alto grau, o ideal é que o espécime seja maior do que nove e cinco milímetros, respectivamente;
- o número de fragmentos amostrados;
- a presença de lesões com alterações histológicas que mimetizam aquelas causadas pelo HPV;

- lesões antigas contendo poucas cópias e baixo índice de replicação viral;
- tipo de lesão, onde lesões de alto grau apresentam taxa menor de replicação viral e produção de virions (TWIGGS et al., 1988; WILBUR et al., 1988; SYRJÄNEN, 1990; BECKMANN et al., 1991; SOLER et al., 1992; VUOPALA et al., 1993; GÓMEZ et al., 1995; GUIOT & RAHIER, 1995; JUNGE et al., 1995; WIKSTRÖM, 1995).

#### **d) fatores relacionados ao HPV**

- o número de células infectadas e a quantidade de cópias virais presentes em cada célula;
- o tipo de infecção viral, se produtiva ou não produtiva;
- a presença de expressão viral periódica e heterogênea em diferentes áreas de uma mesma lesão;
- o estado físico do genoma viral, se integrado ao DNA da célula hospedeira ou na forma episomal (WILBUR et al., 1988; JONES et al., 1990; BECKMANN et al., 1991; SOLER et al., 1992; VUOPALA et al., 1993; GÓMEZ et al., 1995; JUNGE et al., 1995).

#### **e) fixação do tecido**

O tempo decorrido entre a obtenção do espécime a fresco até a sua fixação, o tipo de fixador utilizado e o tempo de fixação, influenciam a sensibilidade da reação, com marcada redução do sinal positivo após uma semana de fixação. Além disso, o tempo de fixação, por sua vez, depende do tipo do espécime e do fixador (HÖFLER, 1987; SOLER et al., 1992; KARLSEN et al., 1994; GUIOT & RAHIER, 1995).

O fixador ideal deve preservar ao máximo a integridade do RNA/DNA celular, manter os detalhes morfológicos e permitir acesso adequado ao RNA/DNA alvo (HÖFLER, 1987; JUNGE et al., 1995).

Existem controvérsias quanto ao melhor fixador entre os diferentes autores. Enquanto que para SOLER et al. (1992) o ideal é a formalina tamponada a 10%, para HÖFLER (1987) e GUIOT & RAHIER (1995) é o paraformaldeído 4% em tampão fosfato ou fosfato-salino. HÖFLER (1987) enfatiza que para que ocorra reação positiva em espécimes fixados em formalina não tamponada, é necessário que a célula contenha mais do que 200 cópias do genoma viral.

## *f) fatores metodológicos*

### *- digestão enzimática:*

A concentração da enzima e o tempo de digestão interferem no resultado da reação e são influenciados pelo tipo de tecido analisado, tipos de fixador e pelo tempo de fixação (NUOVO & RICHART, 1989; GUIOT & RAHIER, 1995).

### *- condições de hibridização:*

GUIOT & RAHIER (1995) referem que a sensibilidade da reação depende mais da temperatura e do tempo das lavagens do que das condições da hibridização, isto é, da temperatura e da composição das soluções de pré-hibridização e de hibridização.

### *- sondas:*

O uso de um número limitado de sondas para os diferentes tipos do HPV é parcialmente responsável pela heterogeneidade dos resultados presentes na literatura (WILBUR et al., 1988; JONES et al., 1990; BECKMANN et al., 1991; SOLER et al., 1992; WIKSTRÖM, 1995). Assim, com a ampliação deste painel, há um aumento do índice de detecção do vírus (JUNGE et al., 1995). A reação também depende da concentração e do tamanho das sondas utilizadas (NUOVO & RICHART, 1989; GUIOT & RAHIER, 1995).

### *- tipo de marcação das sondas:*

As sondas podem ser radioativas ou não radioativas, ligadas à biotina, digoxigenina, ou à fluoresceína, sendo que o tipo de conjugado influencia o resultado da reação (HÖFLER, 1987; GUIOT & RAHIER, 1995).

Embora alguns autores considerem que as sondas radioativas sejam mais sensíveis que as não radioativas (HÖFLER, 1987; SYRJÄNEN, 1990), foram desenvolvidos outros sistemas de detecção para melhorar a sensibilidade destas últimas, sendo que NUOVO & RICHART (1989) e SYRJÄNEN (1990), comparando os dois tipos de sondas, radioativas e não radioativas, encontraram índice de positividade semelhante entre os dois grupos.

ARENDS (1991), utilizando dois conjugados, a biotina e a digoxigenina, notaram que ambas possuíam sensibilidades distintas. As sondas marcadas com digoxigenina foram mais sensíveis, detectando entre uma e 200 cópias virais por célula e tinham coloração de fundo menos intensa, enquanto que as biotinizadas apresentavam maior reação de fundo e sensibilidade de detecção entre dez a 800 cópias virais.

- *sistema de detecção da reação:*

A ampla heterogeneidade na sensibilidade da sonda depende mais do sistema de detecção do sinal utilizado do que do tipo de marcação (HÖFLER, 1987; GUIOT & RAHIER, 1995).

NUOVO & RICHART (1989) e SYRJÄNEN (1990) analisando diferentes “kits” de hibridização molecular *in situ*, observaram que trocando os sistemas de detecção ocorria uma melhora dos sinais positivos nos casos com reação menos intensa e em poucas células. SYRJÄNEN (1990) ressalta que a fosfatase alcalina é mais eficaz do que a peroxidase.

- *amplificação do sinal:*

Com o objetivo de melhorar a qualidade da reação, devido aos espécimes serem originários de material de arquivo, fixados em formalina não tamponada e sem controle do tempo de fixação, utilizamos um sistema de amplificação do sinal, o “Catalysed Signal Amplification”, da DAKO Corporation (K1500) (KEY & PHILLIPS, 1996). Consiste de uma técnica inovadora de coloração imuno-histoquímica, a qual incorpora um método de amplificação do sinal. Baseia-se na precipitação de um composto fenólico biotinilado catalisado pela peroxidase, seguida de uma reação com a estreptavidina-peroxidase, permitindo assim a detecção de baixas quantidades do antígeno-alvo.

Estes autores demonstram, com esta técnica, reação positiva em casos que anteriormente foram negativos através dos métodos usuais, inclusive com a utilização de diluições maiores e com uma sensibilidade 50 vezes superior.

- *sensibilidade da técnica de biologia molecular empregada:*

As divergências entre os resultados da literatura também estão relacionadas à metodologia utilizada para a detecção viral, as quais mostram diferentes graus de sensibilidade (BECKMANN et al., 1991; GOMÉZ et al., 1995; JUNGE et al., 1995).

Estudos comparativos entre as técnicas de HIS e PCR em lesões cervicais de diferentes graus mostraram concordância de 57% no trabalho de TRONCONE et al. (1995), e de 91,7% no de CAVALCANTI, ZARDO, OLIVEIRA (1997).

Na infecção produtiva, em lesões benignas e nas neoplasias intraepiteliais de baixo grau, nas quais existe um maior número de cópias virais, a técnica de HIS possui sensibilidade semelhante ao do PCR. Assim, neste grupo, a hibridização molecular *in situ* é muito útil, por ser um método mais rápido e com um custo menor. Entretanto, em espécimes contendo

DNA celular degenerado e nas neoplasias intraepiteliais de alto grau e invasoras, as quais apresentam geralmente baixo número de cópias virais, deve-se optar por técnicas mais sensíveis, sendo atualmente o PCR o método de escolha (SYRJÄNEN, 1990; SOLER et al., 1992; TRONCONE et al., 1995).

Embora altamente sensível, alguns trabalhos relatam que existem casos onde a reação com o PCR foi negativa e a HIS positiva e estes resultados poderiam ser interpretados como secundários a (PARK et al., 1991a; TRONCONE et al., 1995; FRANCO, 1996):

- infecção focal, presente no espécime destinado à HIS e ausente naquele para o PCR;
- preservação inadequada do material ou degradação do DNA viral;
- fatores inerentes à técnica do PCR como a presença de substâncias inibidoras da reação, ou a outros ainda não identificados e que interferem na amplificação do gene-alvo. Por isso, é imprescindível que este método seja acompanhado de um controle da reação, o qual deve estar presente em todas as células humanas, como por exemplo, a  $\beta$ -globina ou a actina.

Deve ser lembrado que por ser extremamente sensível, o PCR tem a desvantagem de ser capaz de amplificar contaminantes além de pequenas quantidades de DNA-alvo presentes nas lesões. Assim, é muito discutido atualmente, qual é a importância e o significado biológico de se amplificar cópias virais existentes em baixos níveis em uma lesão (TRONCONE et al., 1995).

Finalizando, embora a presença do DNA viral em uma lesão negativa para o antígeno viral seja mais facilmente explicada, secundária à maior sensibilidade da técnica da HIS ou pela ausência da expressão do antígeno do capsídeo em lesões de alto grau (desprovidas de diferenciação celular), também encontramos casos onde algumas lesões foram reativas para o método menos sensível (imuno-histoquímica) e negativas para a HIS. Isto pode ser decorrente da presença de tipos virais diferentes aos das sondas utilizadas, ou devido ao caráter focal da distribuição do DNA e da expressão viral, onde os cortes do espécime estão representados por células diferentes (PILOTTI et al., 1989).

### 1.13. DETECÇÃO DA PROTEÍNA p53 ATRAVÉS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Estudos referentes ao P53 nas lesões de NIV III são raros, sendo que a maioria dos autores analisou o carcinoma escamoso invasivo vulvar, alguns apresentando NIV III adjacente à área de invasão. Assim, na tentativa de contribuir com os escassos trabalhos da literatura, avaliamos também a imunodeteção da proteína p53.

Encontramos positividade para a proteína p53 em oito casos (21,1%) e localizada no epitélio atípico, sendo que em um também estava presente na lesão de condiloma adjacente. Todos eram de intensidade leve, 62,5% apresentavam distribuição focal e 37,5% padrão difuso, identificados em toda a espessura do epitélio em 50% dos casos e nas camadas mais inferiores nos 50% restantes. O HPV foi detectado em 75% das lesões p53-positivas e em 53,3% dos casos negativos. A imunodeteção da proteína p53 não estava relacionada a nenhum dos parâmetros analisados.

A presença de p53 em epitélio normal, reacional e nas lesões intraepiteliais neoplásicas de baixo grau, são geralmente de padrão focal e em poucas células da camada basal do epitélio, enquanto que nas neoplasias de alto grau, pode estar distribuída em toda a sua espessura. Assim, parece que a proteína se acumula com o aumento da severidade da lesão, sugerindo que a sua expressão está relacionada com a proliferação de células anormais e que é um evento precoce na transformação maligna (AKASOFU & ODA, 1995), embora alguns autores a considerem como um evento tardio na evolução da carcinogênese humana (TERVAHAUTA et al., 1993; WALTS et al., 1993; VECCHIONE et al., 1994; ter HARMSEL et al., 1995). Assim como no colo uterino, a sua relação temporal no desenvolvimento da carcinogênese vulvar é também controvertida. Para KOHLBERGER et al. (1998), a ausência de mutações em NIV III sugere que isto seja um fenômeno tardio, enquanto que MILDE-LANGOSCH et al. (1995) a consideram como um evento que ocorre precocemente.

Os resultados são controversos nas lesões de NIV III. PILOTTI et al. (1993b) avaliaram seis lesões de NIV III e encontraram o HPV do tipo 16 em 100% dos casos e p53 em 80%, todos de intensidade leve e com distribuição focal. Estes mesmos autores em outro trabalho (PILOTTI et al., 1995) observaram que todos os seis casos de NIV III apresentavam o DNA do HPV e nenhum tinha p53 aumentada.

TERVAHAUTA et al. (1993) detectaram a proteína p53, de intensidade leve, em uma paciente com NIV III e contendo o HPV tipo 11. As outras, eram mulheres com lesão de carcinoma invasivo.

WALTS et al. (1993), analisando duas lesões intraepiteliais vulvares de baixo grau e em uma de alto grau, encontraram reação p53-positiva em todos os casos, de intensidade leve ou moderada e apenas uma lesão, de baixo grau, continha o HPV.

KOHLBERGER et al. (1998), em 16 casos de NIV III, não detectaram a proteína p53 e 92,9% das lesões continham o DNA do HPV.

KAGIE et al. (1997b), analisando o carcinoma escamoso invasivo da vulva, não observaram correlação com a variante histológica da neoplasia intraepitelial vulvar grau III. A imunodeteção da p53 ocorreu em 18,7% dos casos contendo NIV III basalóide e em 18,2% com o padrão bowenóide, adjacentes às áreas de invasão. Entretanto, deve ser lembrado que este estudo foi realizado em pacientes com carcinoma invasivo associado e não em lesões representadas apenas pela neoplasia intraepitelial.

Embora TERVAHAUTA et al. (1993) considerem que as lesões precursoras contendo o HPV tenham índice de detecção da p53 mais baixa e de menor intensidade, secundária à formação de complexos com o E6 e a uma taxa inferior de mutações, nós, assim como WALTS et al. (1993) e AKASOFU & ODA (1995), não observamos relação entre o resultado positivo e negativo e a intensidade da reação, com a presença e o tipo do HPV. Além disso, deve-se levar em conta que para a detecção de ambos são utilizados cortes histológicos diferentes da lesão, não permitindo assim determinar se as reações positivas estão localizadas nas mesmas células ou em células diferentes.

A relação entre mutação do gene P53 e o HPV é complexa e controversa. Alguns autores referem que neoplasias contendo o HPV apresentam P53 na forma não mutante e nas lesões onde o HPV não é identificado, ocorre mutação gênica (PILOTTI et al., 1993b; WALTS et al., 1993; BERCHUCK et al., 1994; KOHLBERGER et al., 1998). Entretanto, são observadas lesões onde ambos estão presentes ou ausentes (TERVAHAUTA et al., 1993; WALTS et al., 1993; AKASOFU & ODA, 1995; MIWA et al., 1995).

Alguns autores referem boa correlação entre exame imuno-histoquímico e a ocorrência de mutações (BERCHUCK et al., 1994; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; CALZOLARI et al., 1997). Outros, porém, demonstraram a presença de expressão anormal em genes não mutantes e de mutações com níveis de proteínas mutantes não detectáveis (WALTS et al., 1993; BUSBY-EARLE et al., 1994; AKASOFU & ODA, 1995).

PILOTTI et al. (1993b) detectaram o HPV em 100% e a proteína p53 em 80% das lesões de NIV III e nenhum deles tinha mutação.

MILDE-LANGOSCH et al. (1995), em sete lesões de NIV III, identificaram a proteína p53 na camada basal de duas entre três pacientes que apresentavam mutação.

Embora a imunodeteção da p53 não seja uma característica específica para malignidade, o exame de imuno-histoquímica é um método ideal, rápido e eficaz, podendo ser útil na caracterização das lesões displásicas, principalmente nas lesões vulvares, que são geralmente pequenas (WALTS et al., 1993; BERCHUCK et al., 1994; KOHLBERGER et al., 1998). Entretanto são necessários estudos adicionais, com maior número de casos e utilizando-se anticorpos monoclonais para mutantes, na tentativa de se conhecer melhor a relação entre o P53 e o HPV nas lesões de NIV III.

Vários fatores levam ao aumento da proteína p53 e os mecanismos deste acúmulo nas lesões intraepiteliais neoplásicas do trato genital feminino inferior são heterogêneos, complexos e parecem não estar relacionados apenas a fenômenos mutacionais (VECCHIONE et al., 1994; ter HARMSEL et al., 1995).

LAMBKIN et al. (1994) estudaram a relação da proteína p53 com a expressão do seu RNA mensageiro e observaram que o aumento da expressão de um não estava diretamente associado com o aumento do outro e concluíram que a detecção da proteína p53 era secundária à estabilização ou à alteração na conformação da sua estrutura.

O acúmulo e conseqüente detecção da proteína p53 pode ser decorrente de (COOPER et al., 1993; WALTS et al., 1993; HALL & LANE, 1994; LAMBKIN et al., 1994; VECCHIONE et al., 1994; BOSARI & VIALE, 1995; LINDEN, NATHANSON, ZARBO, 1995; ter HARMSEL et al., 1995; CALZOLARI et al., 1997):

- resposta fisiológica do epitélio à fenômenos danosos ao DNA;

- interrupção da homeostasia celular normal do P53, ou alteração da seqüência cronológica do controle celular;
- estabilização mediada pela ligação do P53 com outros produtos celulares como o MDM2, ou à oncoproteínas virais;
- alteração dos genes dependentes do P53;
- presença de mutações no gene P53.

Deve ser lembrado que podem existir lesões onde há o acúmulo proteico e mutação, embora não se consiga identificar esta última secundária à presença de (CALZOLARI et al., 1997):

- mutações localizadas fora das regiões pesquisadas;
- conformações proteicas mutantes que migram como a forma não mutante;
- pequenas quantidades de mutantes, não detectados pela análise.

A detecção de mutação do P53 em lesões onde não é observado o acúmulo da proteína pode ser decorrente da:

- abolição completa da síntese proteica pelo gene mutante;
- a proteína não é suficientemente estável para que consiga atingir os níveis necessários para a sua detecção;
- produção de proteína com alteração na sua conformação, não detectada através do exame imuno-histoquímico;
- perda da atividade exercida pela proteína;
- heterogeneidade intratumoral, com mutação e expressão proteica de caráter focal, ausente na região do fragmento analisado (WALTS et al., 1993; BOSARI & VIALE, 1995; LINDEN et al., 1995; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

Embora a presença de mutações seja mais freqüente em neoplasias desprovidas de infecção viral, mesmo nestas elas são raras, além de também serem detectadas em lesões contendo o HPV. A presença de mutação em tumores HPV positivos pode contribuir para a neoplasia desenvolver o crescimento invasivo (WALTS et al., 1993; MIWA et al., 1995).

A presença do papillomavírus associada à imunodeteção da proteína p53 pode ser explicada pela sua ligação com a oncoproteína E6 viral formando complexos estáveis, por expressão insuficiente da proteína E6, ou por influências opostas dominantes levando à sua estabilização, além dos fatores citados acima (WALTS et al., 1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; KAGIE et al., 1997a). Entretanto, também são observadas lesões com infecção por HPV e contendo ou não mutação, com reação negativa para a proteína p53. A presença de mutação pode não estar associada à perda da habilidade de degradação da proteína p53 pela oncoproteína viral E6, explicando os casos onde é possível detectar o vírus e mutação, mas a reação imuno-histoquímica é negativa (MIWA et al., 1995). Além disso, as lesões contendo o vírus, porém desprovidas de mutações e do acúmulo da proteína p53, podem ser secundárias à sua degradação pela oncoproteína E6 viral (BOSARI & VIALE, 1995; SLAGLE et al., 1998). O índice de degradação e estabilização proteica parece ser, pelo menos em parte, determinado pela seqüência dos aminoácidos da oncoproteína E6 e conseqüentemente pelo seu grau de afinidade com a p53. A proteína p53 ligada a oncoproteínas virais ou na sua forma mutante funciona como agente supressor tumoral ineficaz ou como oncogenes (WALTS et al., 1993).

A não detecção do HPV, da proteína p53 e de mutação pode ser decorrente de:

- todos estão presentes porém, não são detectados através dos métodos utilizados, eles estão presentes;
- a inativação da p53 pelo E6 contribui para o desenvolvimento neoplásico em tumores contendo o HPV, mas a proteína p53 não é essencial nas lesões desprovidas do vírus;
- a proteína p53 é inativada outras substâncias ainda não identificadas, que não a oncoproteína E6;
- outros alvos do HPV, que não a p53, estão envolvidos na iniciação da carcinogênese, como por exemplo o pRB;
- presença de mutações em outros genes que agem como o P53 e resultam em um efeito fisiológico semelhante, ou em genes não relacionados ao P53 e levam a um processo de transformação celular qualitativamente distinto da carcinogênese mediada por HPV (MIWA et al., 1995).

Embora seja uma técnica pouco sensível e a avaliação dos seus resultados subjetiva, ela permite a localização topográfica do sinal positivo, possibilita a correlação entre os seus resultados com a morfologia da lesão (KOHLBERGER et al., 1998).

A utilização de técnicas de recuperação antigênica aumenta a sensibilidade da reação imuno-histoquímica, pois permite a maior exposição dos antígenos através da ruptura das ligações das proteínas celulares com outras macromoléculas, freqüentemente induzidas pelo fixador tecidual. Além disso, este método foi recomendado pelo fabricante das soluções utilizadas no nosso trabalho (DAKO Corporation). Estudos mostram que a utilização de altas temperaturas, como, por exemplo, através do forno de microondas, é mais eficaz do que a digestão enzimática, sendo que esta última apresenta maior taxa de resultados falso-negativos (LAMBKIN et al., 1994; RESNICK et al., 1995).

Deve ser ressaltado que a detecção da proteína supostamente não mutante em epitélio normal, reacional e em neoplasias benignas, embora geralmente de caráter focal e com intensidade fraca, observado em diferentes trabalhos empregando esta técnica, sugere cautela na interpretação dos resultados obtidos, pois não sabemos ao certo quais são os antígenos ou grupos reativos que estão sendo expostos com este método (LAMBKIN et al., 1994; LINDEN et al., 1995). Assim, é necessário que mais estudos sejam realizados para uma padronização adequada da metodologia.

Quanto ao tipo de tampão, ainda não existe um consenso na literatura, como já previamente discutido na detecção do antígeno viral, sendo que TAYLOR et al. (1994) obtiveram melhores resultados com o tampão citrato e com o Tris-HCl.

Outro problema que afeta a interpretação dos resultados é que os anticorpos disponíveis detectam tanto a proteína mutante como a forma não mutante (TERVAHAUTA et al., 1993; WALTERS et al., 1993; BOSARI & VIALE, 1995; LINDEN et al., 1995).

A positividade da reação é influenciada pelo tipo de anticorpo, os quais mostram diferentes graus de sensibilidade e especificidade, secundários à variação dos sítios de ligação com a proteína p53. Trabalhos mostram melhor correlação entre mutação genética e imunorreatividade com os anticorpos monoclonais PAb1801 e com o DO7 da DAKO Corporation e entre eles, o melhor é o DO7 (HALL & LANE, 1994; LAMBKIN et al., 1994; BOSARI & VIALE, 1995; LINDEN et al., 1995; RESNICK et al., 1995).

Além disso, outro fator também importante é a concentração do anticorpo (HALL & LANE, 1994). No nosso trabalho, utilizamos a diluição ótima recomendada pelo fabricante, isto é, entre 1:50 e 1:100.

Entretanto, convém lembrar que só podemos afirmar que a reação é positiva como conseqüência da presença da proteína p53 mutante, com a utilização de anticorpos específicos para a forma mutante, atualmente ainda não disponível, ou com a técnica do PCR e seqüenciamento do DNA. Este último é um método dispendioso, trabalhoso e requer equipamentos sofisticados. Além disso, depende da proporção de proteína mutante e não mutante e do número de células estromais e inflamatórias presentes no espécime e que podem interferir no resultado (BOSARI & VIALE, 1995).

A variabilidade dos resultados observada nos diferentes trabalhos também pode ser secundária aos critérios utilizados na avaliação da positividade das reações. Para uma interpretação adequada é necessário que se determine o grau de positividade e a linha de corte, tendo-se como base a avaliação de controles e do tecido normal, sendo que alguns autores só consideram como positivos os casos que mostram mais de 10% de células coradas (HALL & LANE, 1994; BOSARI & VIALE, 1995; LINDEN et al., 1995).

HALL & LANE (1994) afirmam que é necessário realizar uma quantificação precisa da imunorreatividade, pois o número de células coradas é mais significativo do que a intensidade da coloração por si só. O número de células coradas varia entre diferentes tumores do mesmo tipo histológico e entre áreas distintas na mesma lesão. Referem também a existência de diferentes padrões de coloração e afirmam que estes fenótipos distintos possuem importância significativa no prognóstico. Os autores identificaram três padrões de reatividade:

- maioria das células fortemente positivas, freqüentemente associado à presença de mutação;
- poucas células positivas e de fraca intensidade, relacionada à presença da proteína não mutante evidenciada através de técnicas de recuperação antigênica;
- células isoladas fortemente coradas, provavelmente secundário ao acúmulo de proteína não mutante em resposta a erros genéticos espontâneos, os quais ocorrem mais freqüentemente em tecido neoplásico do que em tecido normal.

Alguns autores questionam se o exame imuno-histoquímico é suficientemente seguro como marcador para malignidade e mutação devido à alta frequência de casos falsos-positivos e negativos (WALTS et al., 1993). Entretanto, outros consideram que esta técnica pode ser útil no rastreamento de possíveis mutações, embora a interpretação dos resultados deva ser cuidadosa, pois:

- os casos negativos não excluem a presença de mutação;
- acúmulo da proteína não indica necessariamente mutação, devendo ser confirmado através do seqüenciamento do DNA;
- significado prognóstico do acúmulo proteico não é necessariamente paralelo e não pode ser automaticamente igualado à presença de mutação (BOSARI & VIALE, 1995; LINDEN et al., 1995; VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996).

*Em resumo*, a detecção da proteína p53 pode indicar que ela é mutante ou está conjugada a outras proteínas e incapaz de ser degradada pelo sistema de proteases, no qual estão envolvidos os produtos gênicos do HPV (AKASOFU & ODA, 1995). Nos casos onde a positividade é focal, também é possível que ela seja secundária à expressão de proteínas não mutantes em células reativas e altamente proliferantes e não pela presença de proteína anormal estável (PILOTTI et al., 1993b; ter HARMSEL et al., 1995; SLAGLE et al., 1998).

Empregamos na nossa pesquisa o anticorpo monoclonal DO-7 (Dako, M-7001), o qual reage com a proteína p53 normal e mutante. Isto explicaria a detecção da proteína na lesão de condiloma, bem como a intensidade leve da reação presente em todos os casos. Assim, é possível que tenhamos identificado a proteína normal em quantidade aumentada e não a forma mutante, hipótese que poderia ser posteriormente verificada em um próximo trabalho, utilizando-se outras técnicas mais elaboradas e específicas, como por exemplo, o seqüenciamento do DNA.

O encontro da p53 em 21,1% dos nossos casos de NIV III é baixa. Frente a este dado, deve ser levado em consideração: o tipo de avaliação e a graduação da reação positiva adotada, a representatividade do material e a sua qualidade, além das influências específicas do método empregado como, por exemplo, o tipo e a concentração do anticorpo, a utilização de técnicas mutação genética para a recuperação antigênica, etc.

Embora esta técnica relativamente simples seja uma ferramenta facilitadora nos estudos do possível valor deste marcador, ainda tem que ser provada, através de mais estudos, a sua importância clínica no diagnóstico, na contribuição da progressão do tumor, na capacidade de prever a resposta da neoplasia a diferentes formas de tratamento e como marcador prognóstico. Além disso, é necessário que se investiguem os mecanismos responsáveis pelo acúmulo proteico em lesões intraepiteliais neoplásicas no trato genital feminino inferior e se pode ser útil em conjunto com a detecção do papillomavírus humano como indicador de progressão e prognóstico das lesões displásicas (HALL & LANE, 1994; TAYLOR et al., 1994; VECCHIONE et al., 1994).

#### 1.14. ETIOLOGIA E FATORES DE RISCO

A neoplasia intraepitelial vulvar grau III é uma condição infreqüente e relativamente pouco estudada quando comparada à neoplasia intraepitelial cervical, cuja incidência é dez vezes maior do que a da lesão vulvar. O aumento na incidência das lesões de NIV III, particularmente nos grupos etários mais jovens, leva a alguns questionamentos (WOODRUFF, 1985; HØRDING et al., 1994; KAUFMAN, 1995; HEROD et al., 1996a):

- seria decorrente do uso liberal de biópsias vulvares, com o diagnóstico precoce de lesões que anteriormente eram ignoradas ?
- a doença é atualmente diferente do ponto de vista histopatológico ?
- seria secundário ao surgimento de novos agentes carcinogênicos que até então não eram conhecidos ?
- existe hoje um maior reconhecimento das doenças virais, como por exemplo o HPV?

O significado biológico da neoplasia intraepitelial vulvar grau III, a sua origem, e o seu prognóstico ainda não estão completamente esclarecidos. Na tentativa de elucidar a sua etiologia, diversos autores procuraram verificar se os fatores de risco para as lesões vulvares eram os mesmos que para a neoplasia cervical. Entretanto, deve-se antes de tudo enfatizar as diferenças existentes entre as duas regiões, embora não se conheça se estas exercem alguma influência:

- micro-ambiente heterogêneo, onde o colo uterino está em contato com o muco cervical e a vulva, com o ambiente externo (PARK et al., 1991a);
- diferença biológica entre o epitélio vulvar, de origem ectodérmica e o da zona de transformação do colo uterino, mesodérmica. Esta desigualdade pode induzir o HPV a produzir lesões morfológicamente distintas e com diferentes potenciais evolutivos, sendo o colo mais susceptível às alterações malignas secundárias às variações sítio-específicas na expressão dos genes transformadores E6 e E7 (RUEDA-LEVERONE et al., 1987; BECKMANN et al., 1991; PARK et al., 1991a);
- baixa detecção do vírus nas lesões de NIV III em relação à neoplasia intraepitelial cervical, sugerindo que o HPV não é cofator essencial pelo menos para uma parcela das pacientes com NIV III (NUOVO et al., 1991b; TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; MITCHELL et al., 1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995);
- todos os casos de carcinoma invasivo cervical são precedidos pela neoplasia intraepitelial, enquanto que não existem evidências de lesão precursora única no carcinoma vulvar. NIC III é encontrado adjacente à neoplasia invasora em cerca de 90% dos casos e NIV III, em apenas 20 a 30% (ZAINO, 1987; TOKI et al., 1991; STURGEON et al., 1992; HØRDING et al., 1993, 1994; JONES, 1995);
- o índice de progressão de NIV III para invasão é menor. Além disso, está frequentemente associado a lesões multifocais e multicêntricas, apresenta menor grau de alterações coilocitóticas, casos de regressão espontânea e aparecimento rápido de lesões precursoras de alto grau (CRUM et al., 1984; PARK et al., 1991a; KAUFMAN, 1995).

Vários fatores de risco têm sido estudados, com resultados discordantes entre os diferentes trabalhos, sendo que algumas pacientes compartilham dos mesmos fatores de risco comportamentais e demográficos com aquelas apresentando neoplasia cervical (STURGEON et al., 1992; JONES, 1995; EDWARDS et al., 1996; TRIMBLE et al., 1996).

SHERMAN et al. (1994), GILES & KNEALE (1995), van BEURDEN et al. (1995, 1998), EDWARDS et al. (1996) e TRIMBLE et al. (1996), encontraram associação significativa com o número de parceiros sexuais, história de verrugas genitais e fumo, presentes em cerca de 75% das pacientes.

EDWARDS et al. (1996) e TRIMBLE et al. (1996), notaram risco aumentado nas mulheres com idade mais jovem da primeira relação sexual, história de citologia cérvico-vaginal alterada e de doenças sexualmente transmissíveis, menor número de gestações e baixo nível sócio-econômico, embora não significante à análise estatística.

Cerca de 15 a 30% das pacientes apresentam lesões de condiloma na vulva e 30% têm história de doenças sexualmente transmissíveis (BUCKLEY et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986; BUSCEMA et al., 1988; TWIGGS et al., 1988; JONES & ROWAN, 1994).

BUCKLEY et al. (1984), SHERMAN et al. (1994) e EDWARDS et al. (1996) referem que além dos citados acima, outros fatores de risco são a idade mais jovem e a presença de neoplasia em outros locais do trato genital feminino inferior. A raça não estava associada às lesões de NIV III.

Outros fatores, porém com resultados inconsistentes na literatura são: baixo nível sócio-econômico e educacional, fatores dietéticos, obesidade, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, doenças imunossupressoras, doenças inflamatórias e distróficas, idade mais jovem do primeiro filho, comportamento sexual e história reprodutiva, uso de anticoncepcional oral, consumo de caféina e fatores ocupacionais (GROSS, 1987; ZAINO, 1987; FU & REAGAN, 1989; BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; MITCHELL et al., 1993; SCHIFFMAN & BRINTON, 1994; KAUFMAN, 1995). SHERMAN et al. (1994) não encontraram associação com fatores reprodutivos e hormonais, endógenos ou exógenos. O papel das lesões distróficas já foi discutido previamente.

A presença de regressão espontânea, de lesões multifocais e multicêntricas e a sua ocorrência em indivíduos imunodeprimidos, sugerem uma origem infecciosa para a neoplasia intraepitelial vulvar grau III (BORNSTEIN et al., 1988a; TWIGGS et al., 1988; HØRDING et al., 1991).

Evidências que apontam para o HPV como possível agente etiológico das lesões de NIV III são: a presença de condiloma ou de alterações coilocitóticas associadas, história prévia de verrugas genitais em 20-30% dos casos e a detecção de partículas ou do DNA viral nas lesões (BUSCEMA et al., 1988; TWIGGS et al., 1988; STURGEON et al., 1992; KAUFMAN, 1995; EDWARDS et al., 1996), sendo que alguns autores afirmam que a alta frequência de infecção por HPV na população é a responsável direta pelo aumento do diagnóstico de NIV III, sobretudo nos grupos etários mais jovens (WOODRUFF, 1985; RIDLEY, 1994; COSTA et al., 1995; KAUFMAN, 1995). O HPV está associado à NIV em ampla faixa etária, sugerindo que o vírus possa ter um papel na neoplasia vulvar em qualquer ponto da vida (HAEFNER et al., 1995). Entretanto, a prevalência da infecção por HPV na população é alta, enquanto que a incidência das lesões de NIV III é baixa, apresentando grande variabilidade na detecção do vírus, indicando assim, a necessidade de co-fatores adicionais atuantes para que estas lesões se desenvolvam (RIDLEY, 1994; COSTA et al., 1995).

Os diferentes perfis clínicos, morfológicos e virais observados nas pacientes com NIV III parecem indicar que esta entidade está representada por um grupo heterogêneo de lesões com etiologias distintas. Em pacientes mais jovens seria secundária a um agente carcinogênico comum, como por exemplo, o HPV e nos grupos etários mais idosos, oriundos de alterações específicas na região vulvar. As lesões de NIV III podem ocorrer sozinhas, associadas ao HPV, ou a alterações distróficas e inflamatórias, sendo que quando associado ao HPV representaria uma entidade distinta (BORNSTEIN et al., 1988a; PARK et al., 1991a; COSTA et al., 1995; HAEFNER et al., 1995; JONES, 1995; ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE, 1996).

*Em resumo*, no nosso trabalho podemos notar a ampla faixa etária das pacientes apresentando neoplasia intraepitelial vulvar grau III, entre 15 e 82 anos, sendo que 29,7% tinham mais de 60 anos. Lesões multicêntricas estavam presentes em 36,8% dos casos e multifocais em 72,2%. A variante histológica predominante foi a bowenóide (92,1%). A alteração epitelial adjacente mais freqüente foi o condiloma, em 45,7% das lesões. A imunodeteção da p53 foi observada em 21,1%. O DNA ou o antígeno do HPV foi detectado em 57,9% dos casos e estava associado apenas à variável idade, com frequência maior nos grupos etários mais jovens (40,8 x 57,3 anos). Os outros parâmetros analisados não foram significantes.

Assim, encontramos uma alta incidência do papilomavírus humano nas lesões de NIV III, sobretudo em pacientes mais jovens, semelhante aos dados da literatura, mesmo com a utilização de técnicas menos sensíveis para a detecção do vírus quando comparadas com os métodos de Southern blot e com a reação em cadeia da polimerase.

No nosso trabalho, o único fator de risco significativo relacionado à infecção por HPV foi a idade mais jovem das pacientes. Parece-nos que o HPV está relacionado à patogênese da NIV III. Embora associado a mulheres mais jovens, a presença do vírus em ampla faixa etária, identificado em 18,2% das pacientes com mais de 60 anos, indica que o vírus pode ser o agente causal em todas as idades, pelo menos em uma minoria dos casos. Ao nosso ver, as lesões distróficas não estão envolvidas na sua etiopatogenia e os casos associados à hiperplasia escamosa, podem perfeitamente corresponder a uma resposta inespecífica do epitélio a estímulos irritativos ou infecciosos.

A incidência da neoplasia intraepitelial vulvar grau III é baixa. Assim, o rastreamento de toda a população se torna muito dispendioso, sendo necessário definir e estabelecer quais os critérios que devem ser utilizados para a sua detecção. Em consequência da sua alta associação com o HPV e lesões multicêntricas, talvez esta seja a população alvo ideal (EDWARDS et al., 1996).

Convém ressaltar a importância de adquirirmos um conhecimento mais profundo destas lesões. Em decorrência da heterogeneidade clínica e sintomatológica e das dificuldades de tratamento, é mandatória a realização de biópsias de qualquer alteração no epitélio da região vulvar para que se obtenha um diagnóstico correto e precoce, além de ser necessário o desenvolvimento de estratégias efetivas para a identificação e combate destas lesões cuja frequência tem aumentado. A detecção precoce permite que se efetue um tratamento menos agressivo, com índices mais baixos de morbidade e de mutilações, causando assim um menor nível de impacto psicológico traumático nestas pacientes.

A presença de lesões multifocais e recorrências frequentes, o baixo índice de progressão para invasão, as dificuldades de tratamento e a alta prevalência do HPV, fazem destas pacientes boas candidatas para se beneficiarem da utilização de vacinas terapêuticas, embora este tipo de tratamento ainda não esteja disponível (van BEURDEN et al., 1995; SONNEX, 1998).

Deve-se efetuar um seguimento prolongado destas pacientes com a realização de exames físicos periódicos devido à alta frequência de multifocalidade, ao aparecimento de novas lesões ou de recorrências e da possibilidade, embora pouco usual, de se desenvolver neoplasia invasora (WOODRUFF, 1991). O conhecimento da sua história natural é incompleto, secundário ao pequeno número de pacientes com esta doença e com seguimento limitado, sendo necessário que mais trabalhos sejam realizados, observando-se cuidadosamente os aspectos histopatológicos e virológicos em estudos prospectivos.

Marcadores genômicos de risco para o desenvolvimento de NIV III ainda não foram estudados, assim como também não se identificaram alterações genéticas específicas para estas lesões. Além disso, não foram pesquisados marcadores da proliferação celular, que poderiam prever o seu comportamento. Estudos com marcadores da diferenciação celular, como a tenascina e queratinas, mostraram diferentes padrões de expressão de acordo com o grau de displasia. Entretanto, ainda não foram isolados marcadores associados à progressão e recorrência destas lesões (EDWARDS et al., 1996).

Embora tenha sido observado o aumento no diagnóstico das lesões de NIV III, a incidência do carcinoma invasivo permanece estável. Entre as explicações possíveis para este fenômeno estão:

- NIV III apresenta baixo potencial de invasão;
- o diagnóstico e tratamento precoce das lesões de NIV III preveniriam o desenvolvimento do carcinoma invasivo;
- as mulheres pertencentes à fase da revolução sexual ainda não são suficientemente idosas para desenvolver carcinoma invasivo;
- ambas possuem etiologias distintas, sendo que em mulheres idosas o carcinoma invasivo não é precedido de neoplasia intraepitelial vulvar e não está associado ao papilomavírus humano, mas sim, relacionado à desordens epiteliais não neoplásicas (HOMESLEY, 1995; HØRDING et al., 1993, 1995; KAUFMAN, 1995).

Entretanto, tudo isto é hipotético até o momento, necessitando de comprovação científica.

## 1.15. HISTÓRIA NATURAL

Por ser uma condição infreqüente, a história natural da neoplasia intraepitelial vulvar é incerta e pouco conhecida. São poucos os trabalhos prospectivos que avaliam a progressão das neoplasias intraepiteliais de baixo para alto grau e neoplasia invasora e geralmente, com uma pequena amostragem de pacientes e um tempo de seguimento muito curto (CRUM et al., 1984, CRUM, 1992; KAUFMAN, 1995; HEROD et al., 1996a).

Parece que a história natural e o potencial de invasão das lesões de NIV III são diferentes das neoplasias intraepiteliais cervicais grau III. Seria a região vulvar mais resistente ou a zona de transformação do colo uterino mais susceptível à infecção por papilomavírus humanos potencialmente oncogênicos? (van BEURDEN et al., 1995; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997).

Embora a regressão espontânea seja pouco freqüente, ela ocorre principalmente em pacientes mais jovens contendo lesões multicêntricas e em gestantes (BUCKLEY et al., 1984; CRUM & BURKETT, 1989; PARK et al., 1991a). Esta observação levou PARK et al. (1991a) a questionarem se o NIV III seria realmente uma neoplasia verdadeira, ou se representaria apenas uma resposta proliferativa do epitélio vulvar à infecção viral.

Análises histológicas provenientes de ressecções de lesões de NIV III identificaram áreas de invasão estromal em dois a 18,8% dos casos (POWELL Jr. et al., 1986; CRUM & BURKETT, 1989; HØRDING et al., 1991, 1995; van BEURDEN et al., 1995). HØRDING et al. (1995) observaram que dentre as 12 pacientes contendo neoplasia invasora associada, nove (75,0%) apresentavam profundidade de invasão inferior a dois milímetros.

Os trabalhos da literatura enfatizam que o índice de progressão é baixo, variando entre zero e 21%, sendo que na maioria dos estudos com pacientes previamente tratadas esta taxa situa-se ao redor de 10% (CRUM et al., 1984; CRUM & BURKETT, 1989; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1995; HEROD et al., 1996a; JUNGE et al., 1997). JONES & ROWAN (1994), estudando 113 lesões de NIV III observaram que 9,7% dos casos evoluíram para invasão, predominantemente no grupo não tratado onde sete de oito (87,5%) progrediram, contra apenas 3,8% no grupo submetido a tratamento.

Vários fatores influenciam o desenvolvimento de lesão invasora, entre eles: a idade, o tempo de duração da lesão, a presença e o tipo específico do HPV, a variante histológica, o método de tratamento, o estado imune da paciente, a ploidia da lesão, a presença de doenças inflamatórias e distróficas associadas, o fumo e a presença de lesões multifocais e multicêntricas (BUCKLEY et al., 1984; CRUM et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986; JONES et al., 1990; WOODRUFF, 1991; BARBERO et al., 1993; JONES & ROWAN, 1994; RIDLEY, 1994; JUNGE et al., 1997). A maioria dos trabalhos aponta como fatores predisponentes mais importantes: pacientes de grupo etário mais idoso, geralmente pós-menopausadas, e a imunodepressão, sendo assim necessário um seguimento rigoroso neste grupo de mulheres (BUCKLEY et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986; CRUM, 1987, 1992; ZAINO, 1987; CRUM & BURKETT, 1989; BARBERO et al., 1990; WOODRUFF, 1991). Entretanto, JONES & ROWAN (1994) e HØRDING et al. (1995) não encontraram diferença significativa entre as idades médias e o estado de saúde das pacientes contendo ou não neoplasia invasora associada à NIV.

Por que as lesões de NIV III evoluem para neoplasia invasora com maior frequência no grupo de pacientes mais idosas? Seriam as mulheres mais jovens biologicamente distintas das mais velhas, com maior resistência imunológica? Ou a idade por si só tem um papel no desenvolvimento do câncer?

O papel das variantes histológicas e das doenças inflamatórias e distróficas na evolução da NIV III é incerto. POWELL Jr. et al. (1986) observaram que 75% das pacientes contendo áreas de invasão apresentavam a variante histológica basalóide e todas as lesões eram multifocais. HAEFNER et al. (1995) encontraram forte associação entre o padrão diferenciado de NIV III com a presença de líquen escleroso e de carcinoma invasivo. Entretanto, HØRDING et al. (1995) não encontraram relação com um tipo histológico específico. Além disso, estes últimos autores identificaram neoplasia invasora em 16% das pacientes contendo NIV III e nenhuma delas, com ou sem invasão, tinha lesão distrófica associada.

Parece que a invasão ocorre mais raramente nas lesões contendo o papilomavírus humano (WOODRUFF, 1991; RIDLEY, 1994), embora HØRDING et al. (1995) não tenham encontrado associação com a presença e com o tipo de HPV.

WOODRUFF (1985) e JONES & ROWAN (1994) referem que as lesões localizadas no meato uretral e na região perianal são as que possuem maior potencial de invasão.

Apesar de 92 a 100% das lesões de NIV III serem aneuplóides, não se sabe porque algumas regridem e raras progridem para invasão (FU et al., 1981; BUCKLEY et al., 1984; POWELL Jr. et al., 1986). FU et al. (1981) observaram que 69% das lesões de NIV III apresentavam alta ploidia e quando associadas à neoplasia invasora, 82% tinha ploidia baixa, sugerindo que certas características citogenéticas, como por exemplo, a baixa ploidia, estão relacionadas à propensão da neoplasia intraepitelial de se tornar invasora. O encontro de NIV com baixa ploidia adjacente à área de invasão pode indicar que estas lesões possuem maior potencial de se tornarem invasoras, ou que a redução do conteúdo de DNA nuclear ocorre posteriormente à invasão.

O tempo de evolução varia entre dois e 25 anos (BARBERO et al., 1990; TOKI et al., 1991; JONES & ROWAN, 1994). CRUM et al. (1984) referem que 80% dos casos progridem em três anos. Este intervalo pequeno em contraste com a diferença de 20 a 30 anos entre as idades médias das pacientes apresentando lesões de NIV III e de carcinoma invasivo, não dá suporte à hipótese de que a sua evolução para neoplasia invasora represente apenas um intervalo de progressão lenta (PARK et al., 1991a; TOKI et al., 1991; STURGEON et al., 1992; JONES & ROWAN, 1994).

É necessário ser cuidadoso frente às pacientes com lesões de NIV III, pois a sua história natural não é completamente conhecida, os sintomas desta doença são muitas vezes discretos e inespecíficos ou ausentes, existe a possibilidade de apresentar doença residual e porque a vulva permanece como uma região de risco em todas as mulheres contendo neoplasia em outros locais do trato genital feminino inferior (JONES, 1995).

O baixo índice de progressão da neoplasia intraepitelial vulvar não traduz verdadeiramente a história natural destas lesões, pois a maioria das pacientes é tratada, alterando assim o curso natural da doença e conseqüentemente, os resultados dos diferentes estudos refletem na verdade a evolução do tratamento e não a sua história natural (JONES & ROWAN, 1994; JONES, 1995; HEROD et al., 1996a). São poucos os trabalhos prospectivos em mulheres não submetidas a tratamento e a resposta final sobre a sua história natural somente poderá ser encontrada após a realização de estudos adicionais

contendo um número suficiente de pacientes não tratadas e observadas durante longos períodos, de preferência por mais de cinco anos (JONES, 1995; EDWARDS et al., 1996; HEROD et al., 1996a).

Em nossa análise das lesões de NIV III, não incluímos os casos que apresentavam neoplasia invasora associada, ou aqueles que desenvolveram invasão posteriormente. Na sua ocorrência eventual, estas pacientes foram catalogadas nos grupos pertinentes, como carcinoma superficialmente invasivo ou carcinoma invasivo, de acordo com a profundidade de invasão estromal e com os critérios previamente descritos na casuística e métodos e serão posteriormente discutidos.

## 2. CARCINOMA ESCAMOSO SUPERFICIALMENTE INVASIVO

Os trabalhos de carcinoma vulvar superficialmente invasivo são escassos na literatura, freqüentemente com pequeno número de casos, ou apenas relatos de casos isolados e muitos incluindo neste grupo lesões com até cinco milímetros de invasão estromal. Assim, enfrentamos certa dificuldade em analisar estes textos e compará-los com os nossos achados, embora também tenhamos plena consciência do número limitado dos nossos casos.

Considerando o conceito atual do carcinoma superficialmente invasivo, isto é, com profundidade de invasão até um milímetro e não incluindo aqueles com relato de caso único, identificamos na revisão da literatura apenas sete trabalhos onde BUSCEMA, STERN, WOODRUFF (1981), HUSSEINZADEH et al. (1991), PILOTTI et al. (1995), van der VELDEN et al. (1996) e KAGIE et al. (1997c), estudaram entre cinco a oito pacientes e KELLEY III et al. (1992) e HEROD et al. (1996b), respectivamente, 24 e 26 casos.

É uma neoplasia rara, onde van der VELDEN et al. (1996) encontraram uma incidência de 4,3% dentre os carcinomas invasivos e KAGIE et al. (1997c), 8%. Na revisão dos arquivos do departamento dos últimos treze anos, encontramos nove casos, com média de 0,7 casos por ano, índice semelhante ao de van der VELDEN et al. (1996). No trabalho de KELLEY III et al. (1992), a incidência foi de um caso por ano e no de HEROD et al. (1996b) 1,7, confirmando portanto, a sua raridade.

A idade das pacientes variou entre 37 e 88 anos, com média de 57,9, próxima aos valores encontrados por KELLEY III et al. (1992), que foi de 60 anos, embora a idade média no trabalho de van der VELDEN et al. (1996) tenha sido menor, 45 anos, assim como no de HEROD et al. (1996b) com média de 36 anos e pico na quarta década.

Identificamos 55,6% de lesões multifocais e igual valor para as lesões multicêntricas, em concordância com os trabalhos de KELLEY III et al. (1992) e HEROD et al. (1996a, 1996b), cuja incidência foi de 50%.

A neoplasia intraepitelial vulvar grau III, em especial as variantes bowenóide e basalóide, está freqüentemente associada ao carcinoma superficialmente invasivo, presente em todos os casos analisados por PILOTTI et al. (1984) e HEROD et al. (1996b). CHOO (1982) identificou NIV III em 87,5%, KELLEY III et al. (1992) em 62,5% e nós, em 88,9% dos espécimes.

A sua relação com as lesões distróficas é incerta, porém, parece ser menos freqüente do que no carcinoma invasivo, sendo que CHOO (1982) observou a presença de líquen escleroso em apenas um caso (3,3%) e HØRDING et al. (1995) em nenhum.

A detecção do HPV é alta, presente em todos os casos de PILOTTI et al. (1995) e em 83% no de PILOTTI et al. (1989), sendo que em nosso estudo encontramos uma positividade mais baixa, em apenas 33,3% dos espécimes. Entretanto, devemos chamar a atenção de que estes autores incluíram neste mesmo grupo também as pacientes com apenas lesões NIV III. Além disso, 20% dos nossos casos estavam representados apenas por biópsias, fornecendo assim, uma amostragem pequena para uma análise adequada.

Embora a idade média dos nossos casos fosse de 46 anos no grupo contendo o vírus e 63,8 para o grupo negativo, esta diferença, assim como os outros parâmetros analisados não foram significativos e interpretamos como resultante do pequeno número de pacientes.

Poucos são os estudos visando a etiopatogenia do carcinoma superficialmente invasivo, cuja origem ainda é incerta. Os aspectos mais estudados e já previamente discutidos no capítulo anterior das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau são:

- origem viral, por papilomavírus humanos, com evolução da infecção para NIV III e progressão subsequente para neoplasia invasora, sobretudo nas pacientes mais idosas e/ou imunodeprimidas e;
- doenças inflamatórias crônicas e distróficas vulvares.

Na maioria dos trabalhos o foco de atenção tem sido a história natural da doença, atualmente ainda pouco compreendida, visando um tratamento menos agressivo e mutilante naquelas pacientes com baixo risco para desenvolver metástases ganglionares.

Embora anteriormente fosse acreditado que estas lesões não apresentavam metástases (HACKER et al., 1984; RUEDA et al., 1994b), trabalhos isolados descrevem a sua ocorrência, com risco de 1% (HICKS, HEMPLING, PIVER, 1993; CAVANAGH & HOFFMAN, 1996). SEDLIS et al. (1987) e HICKS et al. (1993) observaram casos com profundidade de invasão menor do que um milímetro, com metástases ganglionares, mesmo na ausência de invasão vascular. KELLEY III et al. (1992) relatam a presença de neoplasia metastática em uma paciente tratada com linfadenectomia inguinal unilateral negativa e aventam a possibilidade da existência de metástases ocultas. No nosso trabalho não havia metástases nos cinco casos onde foi realizada a linfadenectomia.

A rara presença de metástases levou à pesquisa de fatores que pudessem prever o comportamento biológico da neoplasia, com resultados contraditórios.

HOMESLEY (1995) e CAVANAGH & HOFFMAN (1996) acham que as pacientes com baixo risco de metástases são aquelas que apresentam lesões bem diferenciadas, com bordos compressivos e não confluentes, desprovidas de invasão angio-linfática e aconselham a linfadenectomia nas neoplasias pouco diferenciadas, confluentes, com focos múltiplos de invasão, invasão angio-linfática e com linfonodos suspeitos.

Outros parâmetros também considerados por alguns autores são: o tamanho da lesão, a presença de neoplasia intraepitelial vulvar associada e o volume do tumor (WILKINSON, 1985; KELLEY III et al., 1992). WILKINSON (1985) e CAVANAGH & HOFFMAN (1996) referem que lesões aneuplóides aumentam o risco de metástases e sugerem que nestes casos seja realizada a linfadenectomia.

Encontramos apenas um trabalho na literatura com pesquisa da proteína p53 em carcinoma vulvar superficialmente invasivo, com resultado negativo nos seis casos estudados (PILOTTI et al., 1995). Identificamos reação positiva em 66,7%, dois terços de grau leve.

Até o momento, ainda não foram identificadas as características clínico-patológicas capazes de prever o comportamento biológico desta neoplasia e assim indicar o método terapêutico mais adequado a ser utilizado, sendo que a maioria dos autores ainda considera como tratamento de escolha a excisão ampla da lesão sem a realização da linfadenectomia, com acompanhamento subsequente das pacientes e avaliação histológica

pormenorizada do espécime ressecado (THOMAS et al., 1991; WILKINSON, 1991; KELLEY III et al., 1992; ACOG, 1994; HOMESLEY, 1995). Entretanto, MALFETANO et al. (1985) acham que a ressecção ganglionar é necessária, pois mesmo neste grupo, existe 12% de risco para metástases, devendo ser unilateral ou bilateral, dependendo da localização da lesão.

Existem ainda muitas questões a serem respondidas, sendo necessários estudos prospectivos multicêntricos na tentativa de se coletar um maior número de casos possíveis, com seguimento das pacientes por mais de cinco anos, no intuito de se obter respostas satisfatórias desta entidade tão pouco conhecida (HICKS et al., 1993; HEROD et al., 1996b).

Enquanto isto, é imperativo que os laudos anatomopatológicos sejam elaborados da maneira mais completa possível e devem incluir: a profundidade de invasão e espessura do tumor com identificação do método de medição utilizado, o grau histológico e padrão de infiltração da neoplasia, a presença de envolvimento vâsculo-linfático, o diâmetro macro e microscópico do tumor, a sua localização, o estado da margem e a sua menor medida (WILKINSON, 1991; HOMESLEY, 1995).

Sabemos que nossos casos são poucos e não passíveis de uma análise estatística adequada. Entretanto, a nossa intenção foi a de contribuir e adicionar mais alguns casos para um estudo multicêntrico, além de tentar verificar de qual grupo o carcinoma superficialmente invasivo se aproxima mais, se das lesões de NIV III ou do carcinoma invasivo, análise que será realizada mais adiante.

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA

O carcinoma da vulva é uma doença incomum, oito a dez vezes menos freqüente do que o carcinoma invasivo cervical, representando cerca de 3 a 5% das neoplasias malignas do trato genital feminino (ANDERSEN et al., 1991; BECKMANN et al., 1991; CRUM, 1992; ACOG, 1994; COSTA et al., 1995; GILES & KNEALE, 1995; MONK et al., 1995; EDWARDS et al., 1996; CREASMAN, PHILLIPS, MENCK, 1997; ROSÉN & MALMSTRÖM, 1997; PIURA et al., 1998). Entretanto, a sua incidência varia entre os diferentes países, sendo maior nos menos desenvolvidos, como na América Latina e Ásia. Nos Estados Unidos da América, acomete entre 1 a 2 por 100.000 mulheres (MABUCHI, BROSS, KESSLER, 1985; BRINTON et al., 1990; STURGEON et al., 1992; MITCHELL et al., 1993; GILES & KNEALE, 1995; HOMESLEY, 1995; EDWARDS et al., 1996; FRANCO, 1996; CARLSON et al., 1998; PIURA et al., 1998), com notificação de 4.000 casos novos por ano (KIRSCHNER et al., 1995). No Brasil, esta taxa é de 2,1 em Goiânia e 3,1 por 100.000 mulheres em Porto Alegre (GILES & KNEALE, 1995). Em um levantamento do Ministério da Saúde, realizado entre 1981 e 1985, foram identificados no Brasil 2.451 casos de carcinoma vulvar, sendo que este baixo índice talvez se deva a uma deficiência nos sistemas de registro ou à sub-notificação dos casos (HOTTA, GONÇALVES, LATORRE, 1994).

Na literatura a média de casos analisados por ano é de 6,8, variando entre 1,1 a 15,3 entre os diferentes trabalhos (Tabela 32). A maior amostra foi a de CREASMAN et al. (1997) e os seus dados foram coletados a partir da base de dados do Registro Nacional do Câncer em 1147 hospitais, com uma média de 388 casos por ano, em um período de quatro anos. No nosso estudo, levantamos 129 casos entre os anos de 1983 e 1995, com média de 9,9 casos/ano, valor próximo aos encontrados por HOPKINS et al. (1991), WOODRUFF (1991), LINGARD et al. (1992), MONK et al. (1995) e TRIBBIA et al. (1995).

TABELA 32

Relação do número de casos de carcinoma escamoso invasivo da vulva e o período levantado em diferentes trabalhos da literatura

| Autores                     | Total de casos coletados | Período levantado (em anos) | Média do número de casos levantados por ano |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|---|
| HACKER et al., 1984         | 177                      | 24                          | 7,1   |
| HOPKINS et al., 1991        | 172                      | 14                          | 12,3  |
| HØRDING et al., 1991        | 24                       | 4                           | 6   |
| WOODRUFF, 1991              | 21                       | 2                           | 10,5  |
| LINGARD et al., 1992        | 99                       | 10                          | 9,9   |
| HØRDING et al., 1994        | 78                       | 21                          | 3,7   |
| HOTTA et al., 1994*         | 15                       | 12                          | 1,1   |
| RUEDA et al., 1994a         | 64                       | 21                          | 3   |
| SHERMAN et al., 1994        | 81                       | 12                          | 6,7   |
| MESSING & GALLUP, 1995      | 80                       | 15                          | 5,3   |
| MILDE-LANGOSCH et al., 1995 | 40                       | 9                           | 4,4   |
| MONK et al., 1995           | 111                      | 12                          | 9,2   |
| TRIBBIA et al., 1995        | 37                       | 4                           | 9,2   |
| van der VELDEN et al., 1996 | 138                      | 9                           | 15,3  |
| CREASMAN et al., 1997       | 1553                     | 4                           | 388   |
| IWASAWA et al., 1997        | 74                       | 20                          | 3,7   |
| JONES et al., 1997          | 115                      | 15                          | 7,7   |
| KAGIE et al., 1997a         | 66                       | 10                          | 6,6   |
| McCONNELL et al., 1997      | 121                      | 21                          | 5,8   |
| CARLSON et al., 1998        | 60                       | 16                          | 3,7   |
| PIURA et al., 1998          | 61                       | 36                          | 1,7   |
| PINTO, 1999**               | 184                      | 18                          | 10,2  |

\* Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo, Brasil

\*\* Hospital do Câncer, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, Brasil

Ocorre predominantemente em mulheres mais idosas, geralmente pós-menopausadas, com um aumento contínuo da sua incidência com a progressão da idade, sendo dez vezes maior (20 por 100.000 mulheres) após os 75 anos, em contraste com o carcinoma cervical, onde existe um platô ao redor dos 50-69 anos e declínio após esta idade, talvez secundário à menor atividade sexual desta faixa etária (MENCZER et al., 1982; MABUCHI et al., 1985; CRUM, 1992; HIETANEN et al., 1995b).

Enquanto CREASMAN et al. (1997) relatam um aumento do número de casos de carcinoma invasivo vulvar diagnosticados nas duas últimas décadas, outros não observaram esta diferença (STURGEON et al., 1992; HØRDING et al., 1994; FRANCO, 1996; ROSÉN & MALMSTRÖM, 1997). No nosso trabalho, 39,5% foram diagnosticados

na década de 80 e 60,5% na década de 90. Entretanto, é possível que no futuro haja um incremento na incidência destas lesões por aumento da expectativa de vida da população frente à observação de que esta aumenta em função direta com a idade mais avançada (MENCZER et al., 1982; MABUCHI et al., 1985; IACOBELLIS, MANZIONE, LOMEIO, 1990; CRUM, 1992; HIETANEN et al., 1995b).

Apesar de ser uma doença de mulheres mais velhas, ela pode ocorrer também em grupos etários mais jovens, sendo que alguns trabalhos demonstraram nos últimos anos um aumento da sua incidência neste grupo (ANDERSEN et al., 1991; MESSING & GALLUP, 1995; JONES, BARANYAI, STABLES, 1997), embora isto não tenha sido comprovado em outros (HØRDING et al., 1994; van der VELDEN et al., 1996; CREASMAN et al., 1997).

Por ser uma lesão pouco freqüente, são poucos os trabalhos com grandes amostras de pacientes, favorecendo o conhecimento mais profundo desta entidade à poucos centros do mundo (CREASMAN et al., 1997; PIURA et al., 1998). As inúmeras contradições entre os diferentes estudos são pelo menos em parte secundárias à pequena amostragem de pacientes analisadas.

### 3. 1. DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA

A idade do nosso grupo de estudo variou entre 34 e 89 anos, com média de 67,8 anos, sendo que 3,6% das pacientes tinham 40 anos ou menos, 7,3% entre 41 e 50, 12,7% entre 51 e 60 e 76,4% mais de 61 anos, com pico de incidência entre a sétima e oitava década, em concordância com a maioria dos trabalhos (HØRDING et al., 1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; CREASMAN et al., 1997; JONES et al., 1997; PINTO, 1999). Na literatura, a idade varia entre 18 e 105 anos, com média de 56 a 75,6 anos (IVERSEN, ABELER, AALDERS, 1981; MENCZER et al., 1982; HACKER et al., 1984; BUSCEMA et al., 1988; ANDERSEN et al., 1991; PRETI et al., 1993; HØRDING et al., 1994; IWASAWA et al., 1997; ROSÉN & MALMSTRÖM, 1997), embora a maioria situa-se entre 66 e 68 anos (IACOBELLIS et al., 1990; TOKI et al., 1991; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; JONES et al., 1997; PIURA et al., 1998). Em um estudo brasileiro realizado com 15 pacientes do Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo, a idade variou de 43 a 74

anos, com média de 62,2 anos (HOTTA et al., 1994). Outro, realizado no Hospital do Câncer de São Paulo, mostrou idade variando entre 28 e 91 anos e média de 65,7 anos (PINTO, 1999).

O carcinoma invasivo vulvar é raro em pacientes abaixo de 30 anos, embora existam casos relatados, com uma freqüência de cerca de 1% (NILSSON et al., 1990; CREASMAN et al., 1997). No estudo de CHOO (1982), 56,7% das pacientes tinham menos de 35 anos e destas, 47% apresentavam profundidade de invasão menor do que cinco milímetros.

Na literatura há cerca de 21 casos identificados em mulheres abaixo dos 20 anos (NILSSON et al., 1990), sendo o caso mais novo relatado por CHOO (1982), em uma jovem de 14 anos. NILSSON et al. (1990) descrevem um caso em uma paciente de 16 anos, a qual não apresentava nenhum fator de risco e cuja neoplasia comportou-se de maneira agressiva.

A incidência de carcinoma invasivo vulvar em pacientes com idade inferior a 40 anos varia entre dois e 15%, com média de 8,8%. Mais de 75% delas tem mais de 60 anos (WOODRUFF, 1991; HOMESLEY, 1995; IWASAWA et al., 1997; JONES et al., 1997; PIURA et al., 1998; PINTO, 1999), em concordância com os nossos achados.

Embora EDWARDS et al. (1996) e JONES et al. (1997) tenham observado um aumento na incidência de carcinoma invasivo vulvar nas duas últimas décadas, HØRDING et al. (1994), assim como nós, não confirmaram estes achados.

### **3.2. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS LESÕES**

As lesões apresentam aspecto variado, desde alterações da pigmentação cutânea, até massas infiltrativas e/ou exofíticas, ulceradas ou não. A incidência destes achados é heterogênea (BUSCEMA et al., 1981; CHOO, 1982; ACOG, 1994; HOMESLEY, 1995; EDWARDS et al., 1996). No nosso estudo, 92,7% das lesões eram predominantemente exofíticas, com diâmetro médio de 3,9 centímetros, em concordância com os achados de KIRSCHNER et al. (1995) e PIURA et al. (1998).

### 3.3. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

À semelhança dos trabalhos de HOPKINS et al. (1991) e PIURA et al. (1998), 32,7% das lesões eram bilaterais e 54,5% unilaterais, com distribuição semelhante em ambos os lados da vulva. Ao contrário de BUSCEMA et al. (1981), os quais observaram que 34,5% estavam localizadas na região central, no nosso estudo isto ocorreu em apenas 12,7% dos casos.

Os pequenos lábios foram os mais freqüentemente envolvidos, seguidos pelos grandes lábios e clitóris, em 46,8%, 29% e 18,5%, respectivamente, à semelhança dos achados de HOTTA et al. (1994), TRIBBIA et al. (1995) e CARLSON et al. (1998) e diferente dos trabalhos de HOPKINS et al. (1991), ACOG (1994) e EDWARDS et al. (1996), onde o maior número de casos estavam localizados nos grandes lábios.

O clitóris estava envolvido em 41,8% dos casos, sendo de forma isolada em apenas 9,1% das pacientes, enquanto na literatura este índice situa-se entre 20% e 39% (IACOBELLIS et al., 1990; HOPKINS et al., 1991; HOTTA et al., 1994; KIRSCHNER et al., 1995; CARLSON et al., 1998; PIURA et al., 1998; PINTO, 1999).

Menos freqüente é o envolvimento do períneo, presente nos diferentes trabalhos em cerca de sete a 17% dos casos e no nosso estudo, em 5,4%. Mais raramente ocorre extensão para a vagina, uretra, região perianal e anal, além de lesões extensas envolvendo toda a vulva (BUSCEMA et al., 1981; HACKER et al., 1984; HOPKINS et al., 1991; HOTTA et al., 1994; KIRSCHNER et al., 1995; CAVANAGH & HOFFMAN, 1996).

Deve ser lembrado que o diagnóstico tardio favorece a disseminação da doença e nem sempre é possível estabelecer com precisão o local exato de origem da neoplasia.

### 3.4. FOCALIDADE DAS LESÕES

A maioria das lesões era unifocal e apenas 23,6% multifocais. Na literatura o índice de multifocalidade está entre 0-30% (IVERSEN et al., 1981; HACKER et al., 1984; IACOBELLIS et al., 1990; HUSSEINZADEH et al., 1991; ACOG, 1994; HOMESLEY, 1995; CAVANAGH & HOFFMAN, 1996), em concordância com o nosso estudo.

### 3.5. METÁSTASES GANGLIONARES

No nosso trabalho, 56,8% das pacientes que foram submetidas à linfadenectomia apresentavam metástases ganglionares. Na literatura, este índice varia entre 12,5 a 50% dos casos, com média de 30% nos linfonodos inguinais e 5% nos pélvicos. Cerca de 20 a 30% das pacientes sem linfonodos clinicamente suspeitos possuem metástases ganglionares (DONALDSON et al., 1981; HOFFMAN, KUMAR, MORLEY, 1983; SEDLIS et al., 1987; HOPKINS et al., 1991; THOMAS et al., 1991; PRETI et al., 1993; ACOG, 1994; RUEDA et al., 1994b; KIRSCHNER et al., 1995; MILDELANGOSCH et al., 1995; CREASMAN et al., 1997; KAGIE et al., 1997b, 1997c; McCONNELL et al., 1997; CARLSON et al., 1998; PIURA et al., 1998).

Embora os nossos achados tenham sido próximos aos encontrados por alguns autores (PRETI et al., 1993; CARLSON et al., 1998; PINTO, 1999), a nossa incidência de metástases ganglionares foi maior do que a média relatada na maioria dos trabalhos da literatura. Isto pode ser secundário ao baixo nível sócio-econômico, educacional, cultural e de assistência da saúde da nossa população em relação aos outros países.

Vários parâmetros têm sido analisados e considerados como fatores de risco para metástases ganglionares (DONALDSON et al., 1981; STEHMAN et al., 1992; RUEDA et al., 1994b; HOMESLEY, 1995), entre eles: a idade da paciente, o tamanho da lesão, o grau de diferenciação da neoplasia, a espessura do tumor e/ou profundidade de invasão, a presença de invasão vascular e o estadiamento clínico, entre outros. Entretanto, os resultados são heterogêneos, provavelmente resultantes da utilização de diferentes técnicas metodológicas e análises estatísticas distintas (PRETI et al., 1993). Embora alguns parâmetros possam ser importantes isoladamente, parece que o conjunto de características desfavoráveis exerce uma influência decisiva como indicadores de risco para neoplasia metastática (HOFFMAN et al., 1983; HACKER et al., 1984; SEDLIS et al., 1987).

#### *a) Tamanho do tumor*

No nosso estudo, quando determinamos para fins estatísticos como limite o tamanho de três centímetros houve significância, onde 66,7% dos tumores maiores do que 3 cm tinham envolvimento ganglionar. Entretanto, ao abaixar o limite para dois centímetros, houve tendência estatística ( $p = 0,05$ ).

Embora poucos trabalhos não tenham conseguido relacionar o tamanho da lesão com a presença de metástases (SEDLIS et al., 1987; PRETI et al., 1993), vários demonstraram esta associação (DONALDSON et al., 1981; HOFFMAN et al., 1983; ACOG, 1994; RUEDA et al., 1994b; MESSING & GALLUP, 1995; CREASMAN et al., 1997), sendo que alguns estabeleceram como limite para a análise 2cm (RUEDA et al., 1994b; MESSING & GALLUP, 1995; CREASMAN et al., 1997) e outros, 3cm (DONALDSON et al., 1981; PRETI et al., 1993).

RUEDA et al. (1994b) detectaram metástases ganglionares em 55% das lesões maiores do que dois centímetros.

DONALDSON et al. (1981) definindo como limites dois e três centímetros, verificaram que 15,3% das lesões menores do que dois centímetros e 18,9% daquelas com menos de três centímetros tinham metástases. Por outro lado, nas lesões maiores do que dois e três centímetros, elas estavam presentes em 61,5% e 72,4%, respectivamente. Assim, estes autores estabeleceram como diâmetro crítico, o limite de três centímetros.

HOFFMAN et al. (1983) observaram que o tamanho do tumor só estava relacionado à ocorrência de metástases ganglionares quando este fator era associado à profundidade de invasão estromal.

#### ***b) Tipo histológico da neoplasia***

Como nos trabalhos de KURMAN, TOKI, SCHIFFMAN (1993) e HØRDING et al. (1994), não encontramos relação entre o tipo histológico da neoplasia e a presença de metástases linfonodais.

#### ***c) Grau histológico da neoplasia***

No nosso trabalho os casos estavam distribuídos de acordo com o grau histológico em: 39,5% grau I, 58,1% grau II e 2,3% grau III. Na literatura, esta distribuição é muito variada, sendo que para o grau I está entre 30 a 76%, com média de 48%. Para o grau II, entre 14 a 67% e média de 37% e para o grau III, entre 3 a 25%, e média de 13% (DONALDSON et al., 1981; TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1993; KURMAN et al.,

1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; CREASMAN et al., 1997; KAGIE et al., 1997c; ROSÉN & MALMSTRÖM, 1997; PIURA et al., 1998; PINTO, 1999).

A relação entre o grau de diferenciação da neoplasia e a presença de metástases ganglionares apresenta resultados divergentes entre os diferentes trabalhos. SEDLIS et al. (1987), PRETI et al. (1993), e HØRDING et al. (1994), não conseguiram demonstrar relação entre estes parâmetros, enquanto que DONALDSON et al. (1981), HØRDING et al. (1993), RUEDA et al. (1994b) e CREASMAN et al. (1997) observaram que a incidência de metástases era diretamente proporcional ao aumento do grau histológico do tumor.

DONALDSON et al. (1981) e RUEDA et al. (1994b) detectaram metástases ganglionares respectivamente em 33% e 30% das neoplasias grau I e em 75% e 67% no grau III.

Os nossos resultados foram: 24% para o grau I e 4% para o grau III, embora apenas um caso tenha sido classificado como grau III. Comparando-se os respectivos graus histológicos com a presença de metástases ganglionares, a sua distribuição foi significativa do ponto de vista estatístico apenas para o grau I.

#### ***d) Profundidade de invasão tumoral***

No nosso estudo, a profundidade de invasão variou entre 1,5 milímetro e 15 milímetros, com média de 6,7 mm, sendo que 45,4% tinham 5mm ou menos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por HØRDING et al. (1994), KAGIE et al. (1997c) e McCONNELL et al. (1997), embora nos trabalhos de HACKER et al. (1984) e WILKINSON (1990), 90% dos casos tinham profundidade de invasão menor do que cinco milímetros.

As metástases ganglionares estavam presentes no nosso trabalho em 42% dos casos com profundidade de invasão menor ou igual a 5mm e em 68% das lesões com mais do que 5mm.

Em relação aos casos com profundidade menor do que 5mm, os nossos achados estão próximos aos obtidos por DONALDSON et al. (1981) e HACKER et al. (1984). Entretanto, a maioria dos autores encontraram índices menores do que 26% (BUSCEMA et

al., 1981; WILKINSON, 1990; RUEDA et al., 1994b), embora SEDLIS et al. (1987) tenham detectado metástases em 60,9% dos casos. Além disso, 28,6% dos nossos casos com profundidade menor do que 3 mm tinham neoplasia metastática, semelhante ao dos trabalhos de HACKER et al. (1984) e SEDLIS et al. (1987), enquanto que HOFFMAN et al. (1983) observaram uma incidência de apenas 11,8% neste grupo.

A profundidade de invasão maior do que 5mm mostrou tendência estatística ( $p=0,08$ ) com a presença de metástases ganglionares e estão de acordo com os achados de DONALDSON et al. (1981) e RUEDA et al. (1994b), embora HACKER et al. (1984) e PRETI et al. (1993) tenham encontrado uma incidência de 42,9% e 31,8%, respectivamente.

Quando analisamos os outros fatores de risco para metástases ganglionares, não observamos relação entre a profundidade de invasão estromal e a idade das pacientes, o tamanho do tumor, o tipo histológico, o grau de diferenciação da neoplasia, ou com as alterações presentes no epitélio adjacente à neoplasia invasora, semelhante aos trabalhos de BUSCEMA et al. (1981), KURMAN et al. (1993), HØRDING et al. (1994) e RUEDA et al. (1994a), embora BUSCEMA et al. (1981) tenham encontrado correlação com o grau de diferenciação do tumor.

A presença da proteína p53, mas não a intensidade da reação positiva, foi significativa quando comparamos os grupos de pacientes com profundidade de invasão maior e menor do que três milímetros. Entretanto, a distribuição foi semelhante quando estabelecemos como limite cinco milímetros. McCONNELL et al. (1997) não encontraram relação entre a profundidade média de invasão estromal e a detecção da proteína p53.

Embora a maioria dos autores enfatize que a profundidade de invasão é um fator de risco para neoplasia metastática (DONALDSON et al., 1981; HOFFMAN et al., 1983; KÜRZL et al., 1988; ACOG, 1994; RUEDA et al., 1994b), PRETI et al. (1993) não observaram esta relação. KÜRZL et al. (1988) referem que a profundidade de invasão é o maior preditor de metástases ganglionares quando comparados com o diâmetro e a área da neoplasia.

### ***e) Padrão de invasão e confluência da neoplasia***

Embora não tenhamos avaliado estes parâmetros, eles foram analisados em alguns estudos da literatura. HOFFMAN et al. (1983), HACKER et al. (1984) e ROSS & EHRMANN (1987) encontraram relação entre a presença de metástases ganglionares com o padrão infiltrativo de invasão e com lesões neoplásicas confluentes, ao contrário de BUSCEMA et al. (1981), PRETI et al. (1993) e RUEDA et al. (1994b).

### ***f) Invasão vascular e/ou linfática***

Embora não avaliado por não ser o objetivo do presente trabalho, devemos ressaltar que a maioria dos estudos associa a presença de invasão vascular com metástases ganglionares (DONALDSON et al., 1981; IVERSEN et al., 1981; HOFFMAN et al., 1983; SEDLIS et al., 1987; PRETI et al., 1993; RUEDA et al., 1994b).

IVERSEN et al. (1981) e PRETI et al. (1993) observaram que as lesões com invasão vascular apresentavam envolvimento ganglionar em 40% e 74% dos casos e as sem invasão, apenas 3,3% e 10%, respectivamente. No estudo de RUEDA et al. (1994b), 86% das lesões com invasão vascular tinham metástases ganglionares. Contrariamente, BUSCEMA et al. (1981) e ROSS & EHRMANN (1987) não obtiveram estes resultados.

### ***g) Outros parâmetros***

Outros fatores menos estudados e que necessitam maiores investigações são:

PRETI et al. (1993) e RUEDA et al. (1994b) avaliaram o grau de inflamação e necrose, bem como o índice mitótico, grau nuclear e de queratinização da neoplasia e estes fatores não estavam associados à presença de metástases.

O tipo de alteração no epitélio adjacente à neoplasia invasora, como NIV III e distrofia, não estava relacionado ao envolvimento ganglionar no nosso estudo, assim como os resultados obtidos por RUEDA et al. (1994a) e CARLSON et al. (1998). Também não foram significantes: a idade média das pacientes, a presença de lesões multifocais e de alterações coilocitóticas.

Em concordância com os estudos de SEDLIS et al. (1987) e STEHMAN et al.

(1992), observamos que a presença de neoplasia na linha média, isto é, no clitóris e períneo, é fator de risco para metástases. Dentre as pacientes com lesão na região clitoriana, 64% tinham metástases linfonodais e 21% não.

A presença do papilomavírus humano na vulva não foi fator de risco para metástases no nosso trabalho e de NUOVO et al. (1991b), HØRDING et al. (1993), MONK et al. (1995) e KAGIE et al. (1997c).

HUSSEINZADEH et al. (1991) observaram que nenhuma paciente com lesões multifocais e contendo o HPV tinham metástases.

Embora NUOVO et al. (1991b) tenham verificado que lesões contendo o vírus tendem a serem menores e com maior índice de metástases (43%, contra 25% do grupo sem o vírus), estes achados não foram significativos através da análise estatística.

Apesar da presença de metástases não ter sido influenciada pela imunodeteção da proteína p53 no nosso estudo e de WALKER et al. (1989), KAGIE et al. (1997a) e McCONNELL et al. (1997), estes autores referem que as pacientes com neoplasia metastática e ausência da proteína, apresentam tendência a um maior intervalo de tempo livre de doença em relação ao grupo com reação positiva para a p53. Entretanto, eles enfatizam que estes resultados estão baseados em poucos casos analisados, embora possam ter relevância terapêutica como preditores da resposta ao tratamento radioterápico e/ou quimioterápico.

MILDE-LANGOSCH et al. (1995) e PILOTTI et al. (1995) encontraram relação entre a detecção de mutação no gene P53 e de imunodeteção da proteína com a presença de metástases ganglionares.

### **3.6. RECIDIVA DA NEOPLASIA**

Detectamos recorrência da neoplasia em 16,4% dos casos, embora devemos ressaltar que este não era um dos nossos objetivos, e estas lesões foram identificadas dentro do período do levantamento realizado, isto é, entre os anos de 1983 e 1995, devendo ser esta incidência certamente maior do que o observado. Entretanto, estes achados estão

próximos aos reportados por BUSCEMA et al. (1981), IVERSEN et al. (1981); HØRDING et al. (1991) e HUSSEINZADEH et al. (1991), acima dos 4% do trabalho de HACKER et al. (1984) e abaixo dos 41% encontrado por CHOO (1982). Na literatura, o índice de lesões recorrentes varia entre 15 a 40%, com média geral ao redor de 22% (LINGARD et al., 1992; KIRSCHNER et al., 1995; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; CAVANAGH & HOFFMAN, 1996; PIURA et al., 1998).

Embora tenhamos considerado como recorrentes somente as lesões localizadas na região vulvar, a maioria dos trabalhos engloba tanto as originadas na vulva como aquelas nos linfonodos inguinais e as metástases à distância, com uma frequência de 60%, 6,7-35% e 5-28,9%, respectivamente (IVERSEN et al., 1981; KIRSCHNER et al., 1995; CAVANAGH & HOFFMAN, 1996).

Vários são os fatores relacionados à lesão recorrente. A maioria dos trabalhos encontrou associação com o tamanho do tumor, a presença de metástases ganglionares, o estadiamento da neoplasia e o envolvimento das margens cirúrgicas (MALFETANO et al., 1985; ROSS & EHRMANN, 1987; LINGARD et al., 1992; HØRDING et al., 1993; MESSING & GALLUP, 1995; CAVANAGH & HOFFMAN, 1996). Entre os outros fatores citados estão: a presença de lesões multifocais, a localização na região central da vulva e a profundidade de invasão tumoral (LINGARD et al., 1992). Entretanto, alguns autores não conseguiram correlacionar a presença de lesões recorrentes com o estadiamento do tumor (PIURA et al., 1998), com o grau histológico (MILDE-LANGOSCH et al., 1995), ou com a presença de lesões primárias múltiplas (IVERSEN et al., 1981).

CAVANAGH & HOFFMAN (1996) e PINTO (1999) encontraram relação entre a profundidade de invasão e taxa de recorrência, ao contrário dos estudos de IVERSEN et al. (1981) e PODCZASKI et al. (1990). Estes últimos relatam o caso de duas pacientes com profundidade de invasão de 1,5 e 2 milímetros respectivamente e que apresentaram lesões recorrentes e evoluíram para óbito.

HACKER et al. (1984), ROSS & EHRMANN (1987), LINGARD et al. (1992) e MESSING & GALLUP (1995), referem que tanto a excisão local radical quanto a vulvectomia apresentam taxas de recorrências semelhantes, e que a recidiva está mais relacionada à presença de tumor na margem de ressecção do que com a extensão da cirurgia. Entretanto, alguns trabalhos (IVERSEN et al., 1981; KIRSCHNER et al., 1995;

KAGIE et al., 1997c; PIURA et al., 1998) mostram que o envolvimento da margem ocorre em 11,5 a 25,7% dos casos e não está associado à recidiva. STEHMAN et al. (1992) encontraram maiores índices de recidivas em pacientes com margens envolvidas, embora a taxa de mortalidade tenha sido semelhante nos dois grupos. O envolvimento das margens estava associado a neoplasias recidivantes, bem como à menor sobrevida no trabalho de PINTO (1999).

A presença do HPV, da proteína p53, ou de mutação do gene supressor tumoral P53, não estavam relacionadas à neoplasia recorrente nos estudos de HUSSEINZADEH et al. (1991), HØRDING et al. (1993), KAGIE et al. (1997a, 1997b) e McCONNELL et al. (1997).

PINTO (1999) observou que a presença de metástases ganglionares, o diâmetro do tumor e a variante basalóide estavam relacionados à presença de lesões recidivantes. Entretanto, não foi influenciada pela presença do HPV e o infiltrado inflamatório foi um fator protetor para recorrências.

No nosso trabalho, as lesões recorrentes estavam significativamente associadas à idade mais jovem, respectivamente, 54,6 e 70,3 anos e sem relação com os outros parâmetros analisados, ao contrário de HØRDING et al. (1993), os quais observaram um predomínio em pacientes um pouco mais idosas, respectivamente, 65 e 70 anos, embora não significante do ponto de vista estatístico.

Alguns autores consideram que muitos casos descritos na literatura como recorrências, seriam na verdade um segundo tumor primário, ou proveniente de lesão multifocal não diagnosticada, pois eles notaram que cerca de 70% delas originavam-se longe da neoplasia primária ou na região contra-lateral (CHOO, 1982; STEHMAN et al., 1992). Por outro lado, STEHMAN et al. (1992) observaram que as recidivas na região inguinal ocorriam do lado operado e com gânglios inicialmente negativos em 66,7% dos casos e concluíram que isto ocorreu devido à remoção incompleta dos linfonodos femorais superficiais ou profundos e que esta ressecção incompleta está fortemente associada à presença de recorrências inguinais, identificadas em 71,4% dos casos e à alta incidência de mortalidade.

### 3. 7. ETIOLOGIA, PATOGÊNESE E FATORES DE RISCO

A identificação de mulheres de risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical e endometrial levou a um aumento na sobrevida destas pacientes. Entretanto, na região vulvar estes fatores de risco ainda são pouco conhecidos e controvertidos. Além disso, as alterações histopatológicas precursoras importantes no desenvolvimento da neoplasia invasora, ainda estão pouco definidas (KAGIE et al., 1997c).

Possivelmente, por ser uma neoplasia pouco freqüente, a sua investigação epidemiológica tem sido pequena, com poucos dados disponíveis na literatura, fazendo com que a sua história natural seja pouco compreendida (STURGEON et al., 1992; GILES & KNEALE, 1995; McCONNELL et al., 1997). A sua etiologia é ainda incerta, porém considerada como multifatorial (ACOG, 1994; EDWARDS et al., 1996).

Dentre os fatores de risco descritos na literatura, embora muitos deles não tenham sido avaliados no nosso trabalho estão:

#### 3. 7. 1. *Etnia*

Embora citado como fator de risco, não existem fortes evidências de associação entre fator racial e o carcinoma invasivo da vulva.

No nosso estudo, 92,7% das pacientes eram caucasóides, em concordância com a literatura cuja incidência situa-se ao redor de 90% (MABUCHI et al., 1985; ANDERSEN et al., 1991; HOTTA et al., 1994; KIRSCHNER et al., 1995; CREASMAN et al., 1997; PINTO, 1999). Entretanto, EDWARDS et al. (1996) relatam uma maior incidência em mulheres afro-americanas. É necessário ser ressaltado que alguns fatores considerados como confundidores como, por exemplo, o nível sócio-econômico e educacional e o acesso a tratamento médico, não foram analisados nestes trabalhos.

#### 3. 7. 2. *Nível sócio-econômico e educacional*

Estes parâmetros são de difícil quantificação e podem mascarar outros fatores de risco como: a higiene pessoal, estilo de vida e acesso ao tratamento de saúde. O nível educacional é considerado como um medidor do estado sócio-econômico de uma população (EDWARDS et al., 1996).

BRINTON et al. (1990) e PARAZZINI et al. (1995) observaram que o risco para o carcinoma vulvar era inversamente proporcional ao nível sócio-econômico e educacional, ao contrário de MABUCHI et al. (1985) e TRIMBLE et al. (1996), os quais não encontraram esta correlação.

### **3. 7. 3. Fatores ambientais e ocupacionais**

Informações diretas sobre a exposição a carcinógenos ambientais são escassas e se a sua via é tópica ou sistêmica ainda não está clara (CRUM, 1992).

Parece haver uma relação com determinados fatores ocupacionais como: o trabalho em certos locais relacionados ao vestuário (lavanderias, limpeza e indústria), exposição industrial à produtos oleosos e arsênico, trabalhos domésticos e tinturas de cabelo. Entretanto, pode ser apenas coincidental, ou refletir uma sensibilidade especial do tecido vulvar à ação de carcinógenos específicos, os quais atuariam de forma direta ou indireta nesta região (MABUCHI et al., 1985; GILES & KNEALE, 1995; EDWARDS et al., 1996; CARLSON et al., 1998).

Esta susceptibilidade pode ser secundária à presença de características especiais da flora microbiológica vulvar com tendência ao desenvolvimento de dermatites irritantes, a uma maior eliminação de água trans-epidérmica e absorção percutânea de solventes orgânicos do que os sítios extragenitais, tornando-a assim mais sensível à exposição direta dos carcinógenos ambientais. Além disso, podem ocorrer danos ao DNA através da formação de radicais livres gerados por processos biológicos como, por exemplo, a inflamação, resultando em mutações (CARLSON et al., 1998).

### **3. 7. 4. Fatores dietéticos**

Embora estes fatores tenham sido sugeridos, existem poucos trabalhos disponíveis sobre este assunto, com pequeno número de casos, porções não quantificadas e número limitado de itens alimentares.

PARAZZINI et al. (1995) identificaram correlação inversa com o consumo de vegetais verdes. STURGEON et al. (1991) ao contrário, não conseguiram estabelecer esta relação. Em ambos os trabalhos, foi observado um efeito protetor do  $\alpha$ -caroteno.

A ingestão de leite, fígado e carne (PARAZZINI et al., 1995), bem como das vitaminas A, C, folato, frutas cítricas e legumes (STURGEON et al., 1991), também não estavam associados ao carcinoma vulvar.

STURGEON et al. (1991) referem risco aumentado nas pacientes consumidoras de café, diferente dos achados de MABUCHI et al. (1985) e PARAZZINI et al. (1995), embora os primeiros tenham observado relação com a ingestão de altas doses.

O consumo de álcool não foi fator de risco importante nos trabalhos de MABUCHI et al. (1985), STURGEON et al. (1991) e PARAZZINI et al. (1995).

### **3. 7. 5. Fumo**

Os resultados dos diferentes trabalhos são contraditórios, alguns enfatizando o fumo como fator de risco (BRINTON et al., 1990; MITCHELL et al., 1993; SHERMAN et al., 1994; GILES & KNEALE, 1995; EDWARDS et al., 1996), e outros não (MABUCHI et al., 1985; PARAZZINI et al., 1995).

LEE et al. (1994) e KIRSCHNER et al. (1995) referem que o fumo está relacionado ao carcinoma invasivo vulvar em mulheres mais jovens contendo infecção por HPV e neoplasia multicêntrica. BRINTON et al. (1990) enfatizam a importância da associação do fumo com as verrugas genitais, aumentando o risco destas pacientes de desenvolverem neoplasia invasora em 35 vezes.

TRIMBLE et al. (1996) não encontraram relação com o fumo entre as pacientes com neoplasia vulvar e o grupo controle. Entretanto, havia diferença significativa quando compararam as mulheres contendo a variante usual do carcinoma invasivo com aquelas com os tipos bowenóide e basalóide.

KIRSCHNER et al. (1995) analisando pacientes fumantes e não fumantes com carcinoma invasivo, observaram que embora não apresentassem diferenças no estágio da doença, o consumo de maior número de cigarros estava associado a um pior prognóstico, provavelmente secundário a um efeito sistêmico do fumo sobre o sistema imune.

Os possíveis mecanismos de ação do cigarro já foram discutidos anteriormente.

### **3. 7. 6. Doenças sistêmicas e neoplasias**

Embora alguns trabalhos mais antigos cite como fatores de risco a obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial e neoplasias, os resultados são contraditórios e a maioria dos estudos não conseguiu estabelecer esta relação e consideram que estas enfermidades estão provavelmente relacionadas à faixa etária mais avançada deste grupo de mulheres (MABUCHI et al., 1985; BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; SHERMAN et al., 1994; GILES & KNEALE, 1995; MONK et al., 1995; EDWARDS et al., 1996; PIURA et al., 1998).

MABUCHI et al. (1985) encontraram associação com história médica de outras neoplasias, principalmente urogenitais. Este assunto, enfatizando as neoplasias associadas e localizadas no trato genital feminino inferior, será discutido posteriormente.

### **3. 7. 7. Imunidade**

A imunidade do hospedeiro tem sido consistentemente citada como um fator de risco importante, principalmente no grupo de pacientes mais jovens (CRUM & BURKETT, 1989; ROMAN et al., 1991; COSTA et al., 1995; HOMESLEY, 1995) e correlacionada com enfermidades imunossupressoras como: diabetes mellitus, doenças auto-imunes e do colágeno, transplantados e outras neoplasias malignas (EDWARDS et al., 1996).

### **3. 7. 8. Fatores reprodutivos e hormonais**

Embora alguns estudos tenham correlacionado risco aumentado com certos padrões reprodutivos e hormonais específicos, trabalhos mais recentes não conseguiram demonstrar um padrão de risco consistente e semelhante ao dos tumores reconhecidamente contendo um componente hormônio-dependente como, por exemplo, os de origem endometrial e mamária (MABUCHI et al., 1985; BRINTON et al., 1990; GILES & KNEALE, 1995; EDWARDS et al., 1996; ROSÉN & MALMSTRÖM, 1997; PIURA et al., 1998). Foi demonstrado que na região vulvar a quantidade de receptores para o estrógeno, progesterona e andrógeno é menor (SHERMAN et al., 1994).

Quanto ao uso de hormônios exógenos e de anticoncepcionais orais, os achados são inconclusivos (CRUM & BURKETT, 1989; STURGEON et al., 1992; EDWARDS et

al., 1996), sendo que MABUCHI et al. (1985), BRINTON et al. (1990) e GILES & KNEALE (1995), não encontraram risco aumentado em usuárias destas substâncias.

### **3. 7. 9. Idade**

A incidência da neoplasia vulvar é um reflexo direto do aumento da longevidade das pacientes, sendo um fator de risco importante naquelas com mais de 70 anos (EDWARDS et al., 1996; KOHLBERGER et al., 1998; PIURA et al., 1998).

Alguns trabalhos têm documentado nos últimos anos um crescimento destas lesões invasoras em pacientes mais jovens e interpretado como secundário a mudanças no comportamento sexual da população, levando a um aumento na incidência da infecção por HPV e de NIV III nas últimas décadas (CHOO, 1982; CRUM, 1982; BRINTON et al., 1990; ANDERSEN et al., 1991; STURGEON et al., 1992; RIDLEY, 1994; SHERMAN et al., 1994; COSTA et al., 1995; MESSING & GALLUP, 1995; MONK et al., 1995; IWASAWA et al., 1997; JONES et al., 1997; KAGIE et al., 1997b). A presença de infecções genitais e de condições imunossupressoras como: gestação, doenças auto-imunes e transplantes renais, entre outros, têm sido citados como fatores predisponentes neste grupo de mulheres (EDWARDS et al., 1996). Entretanto, CHOO (1982) e IWASAWA et al. (1997) não conseguiram demonstrar esta relação.

### **3. 7. 10. Comportamento sexual e infecções genitais**

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma discrepância entre os fatores sexuais e o carcinoma invasivo da vulva. Alguns trabalhos mostram que principalmente as pacientes mais jovens com carcinoma vulvar possuem alguns fatores de risco identificados para o carcinoma do colo uterino, enquanto que outros não observaram relação com estes fatores (MABUCHI et al., 1985; GILES & KNEALE, 1995; PARAZZINI et al., 1995; EDWARDS et al., 1996; PIURA et al., 1998). Assim, parece que a atividade sexual é importante em alguns casos, embora isto não seja verdadeiro para a maioria.

BRINTON et al. (1990) encontraram diferentes níveis de risco de acordo com os métodos contraceptivos utilizados, e observaram que o uso do condom estava relacionado a um risco 50% menor para neoplasia vulvar e não estava associado com o uso do dispositivo intra-uterino (DIU), reforçando que, pelo menos para um subgrupo de

pacientes, o comportamento sexual está relacionado ao desenvolvimento da neoplasia vulvar. Entretanto, MABUCHI et al. (1985), em estudo de casos-controle, não encontraram relação com o uso dos diferentes métodos anticoncepcionais.

Embora relatada na literatura a associação de neoplasia vulvar com a história de doenças sexualmente transmissíveis, a maioria dos autores não conseguiu demonstrar uma relação estatisticamente significativa, sugerindo que sejam talvez, apenas marcadores da atividade sexual (BUSCEMA et al., 1981; MABUCHI et al., 1985; BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; OGUNBIYI et al., 1994; RIDLEY, 1994).

TRIMBLE et al. (1996) observaram que embora as pacientes com história de doenças sexualmente transmissíveis tivessem um risco duas a três vezes maior, os dados não foram significantes do ponto de vista estatístico.

CHOO (1982) analisando 17 mulheres com carcinoma invasivo da vulva e com idade inferior a 35 anos, notou que doença venérea não foi um fator predisponente.

SHERMAN et al. (1991) realizaram estudo sorológico para doenças sexualmente transmissíveis em mulheres com carcinoma invasivo vulvar, compararam os resultados com casos-controle e observaram risco aumentado para câncer vulvar em pacientes com história prévia de gonorréia.

BRINTON et al. (1990) e COSTA et al. (1990), identificaram risco aumentado em pacientes com infecção pelo HSV2, sendo que COSTA et al. (1990) detectaram o antígeno viral em 75% das mulheres com carcinoma invasivo vulvar através da técnica da imuno-histoquímica.

O vírus Epstein-Barr tem sido pesquisado na região vulvar, sendo que CHEUNG et al. (1993) observou positividade em 12,5% das pacientes com carcinoma vulvar. VOOG (1996) encontraram através da técnica do Southern blot 48% de positividade em mucosa vulvar aceto-branca. Embora seja um vírus com potencial oncogênico, ainda não foi provada a possibilidade de transmissão sexual, podendo ser apenas um local de reservatório viral, devendo ser mais bem investigado (VOOG, 1996).

A maioria dos autores concorda que a história de verrugas genitais é um fator de risco importante para o carcinoma vulvar (BRINTON et al., 1990; SHERMAN et al.,

1991, 1994; FRANCO, 1996), presentes em 3 a 27% dos casos (CRUM, 1992; OGUNBIYI et al., 1994). BRINTON et al. (1990) e SHERMAN et al. (1991) relatam um risco relativo de 15,2 e 17,3 vezes, respectivamente. Foi demonstrado que pacientes contendo verrugas virais apresentam resposta imune alterada (CRUM & BURKETT, 1989).

Outro fator de risco relatado na literatura é a presença de história de outras neoplasias localizadas no trato urogenital (MABUCHI et al., 1985; BORNSTEIN et al., 1988a; BRINTON et al., 1990; SHERMAN et al., 1994; GILES & KNEALE, 1995; EDWARDS et al., 1996), com risco 2,9 vezes maior (GILES & KNEALE, 1995). MABUCHI et al. (1985) questiona se isto não seria secundário às alterações induzidas pelo tratamento radioterápico prévio. Entretanto, a alta associação com o carcinoma da cérvix uterina, presente em cerca de 15% a 25% dos casos, também pode indicar um efeito de campo e uma resposta desta região a um agente carcinógeno comum (BUSCEMA et al., 1981, 1988; HACKER et al., 1984; ROSS & EHRMANN, 1987; BORNSTEIN et al., 1988a; HØRDING et al., 1991, 1994; CRUM, 1992; MITCHELL et al., 1993; SHERMAN et al., 1994; JONES et al., 1997).

BRINTON et al. (1990) referem que o carcinoma vulvar ocorre mais freqüentemente em mulheres com carcinoma primário do colo uterino. Dos 55 casos estudados por nós, detectamos neoplasia multicêntrica em quatro (7,3%), duas apresentando neoplasia intraepitelial vaginal de alto grau e duas, carcinoma invasivo da cérvix uterina.

A coexistência de condiloma com carcinoma vulvar tem sido observada em sete a 26% dos casos, sobretudo em mulheres mais jovens. Entretanto, a sua relação temporal, o seu mecanismo de ação e a porcentagem de lesões de condiloma que evoluem para neoplasia invasora ainda não foram determinados, embora pareça ser um evento infreqüente (CRUM & BURKETT, 1989; BRINTON et al., 1990; HUSSEINZADEH et al., 1991; CRUM, 1992; HOTTA et al., 1994).

O carcinoma vulvar era anteriormente considerado como uma doença de mulheres idosas e de etiologia desconhecida. Entretanto, observou-se uma mudança no perfil epidemiológico desta doença nas duas últimas décadas, com uma queda na faixa etária da população atingida. O aumento do diagnóstico de NIV e de carcinoma invasivo em mulheres mais jovens, o relato de alguns dos fatores de risco associados à neoplasia

cervical, a presença de história de verrugas genitais e a detecção do antígeno ou DNA do HPV em algumas lesões, tem indicado a possibilidade do vírus ser um dos fatores de risco no desenvolvimento do carcinoma invasivo vulvar (BRINTON et al., 1990; ANDERSEN et al., 1991; HUSSEINZADEH et al., 1991; STURGEON et al., 1992; HØRDING et al., 1994; HOTTA et al., 1994; MONK et al., 1995; IWASAWA et al., 1997).

A relação entre o HPV e o carcinoma vulvar não é tão clara como no colo uterino, sendo fraca e inconsistente e os estudos epidemiológicos e histopatológicos têm demonstrado resultados conflitantes quanto à magnitude do seu papel nestas lesões (BRINTON et al., 1990; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1993; EDWARDS et al., 1996; KAGIE et al., 1997b).

O HPV é encontrado em 10 a 60% dos carcinomas invasivos vulvares (NUOVO et al., 1991b; TOKI et al., 1991; LEE et al., 1994; TRIMBLE et al., 1996; KAGIE et al., 1997b, 1997c), dependendo do método de detecção utilizado. Resumidamente, entre as possíveis explicações para esta variabilidade na detecção do vírus estão: a ausência real do vírus na lesão, variação geográfica nos índices de infecção viral, a utilização de diferentes técnicas de detecção e graus variados de sensibilidade, casuísticas pequenas e a preservação do espécime, entre outros (ANSINK et al., 1994; WIKSTRÖM, 1995; IWASAWA et al., 1997).

Com a técnica da hibridização molecular *in situ* biotinizada, a positividade varia entre 11 e 70%, embora na maioria dos estudos encontra-se ao redor de 20 e 30% (ANDERSEN et al., 1991; PARK et al., 1991a; TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1995; PILOTTI et al., 1995). TOKI et al. (1991) e PILOTTI et al. (1995), detectaram o HPV respectivamente em 27% e 12% dos casos através da hibridização *in situ*; com a reação em cadeia da polimerase este índice aumentou para 43% e 29%.

Através do PCR, que é uma técnica mais sensível, na maioria dos trabalhos a positividade está entre 30 e 60%, mostrando que a presença do HPV nas neoplasias invasoras da vulva é menos freqüente do que no colo uterino (HØRDING et al., 1991, 1993, 1994; NUOVO et al., 1991b; TOKI et al., 1991; ANSINK et al., 1994; LEE et al., 1994; TATE et al., 1994; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; MONK et al., 1995; KIM et al., 1996; IWASAWA et al., 1997). HINES et al. (1995) e KAGIE et al. (1997b) detectaram o vírus em 20% dos casos, PINTO (1999) em 24,2% e PARK et al. (1991a) em 83%.

Na região vulvar, 70 a 90% dos papilomavírus humanos são do tipo 16, e 5 a 20% dos tipos 18 ou 33 (TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1993, 1994; TATE et al., 1994; HINES et al., 1995; MONK et al., 1995; PILOTTI et al., 1995; KIM et al., 1996; KAGIE et al., 1997b; PINTO, 1999). O HPV 45 é raramente identificado, com índices de 6 a 7%, bem como o HPV 6/11. O HPV 6/11 estava presente em respectivamente 2% e 5% dos casos nos trabalhos de MONK et al. (1995) e PINTO (1999) e em 50% nos de SUTTON et al. (1987), metade deles associados aos HPV 16/18. Infecção mista ocorreu em 4% dos casos estudados por HØRDING et al. (1994) e IWASAWA et al. (1997).

No carcinoma invasivo cervical, o índice de detecção para os HPVs 16 e 18 está entre 55-70% e 3-20% respectivamente e menos de 10% para os tipos 31/33/35 (SUTTON et al., 1987; BARNES et al., 1988; HELLAND et al., 1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995). Parece que existe no colo uterino uma maior heterogeneidade de tipos virais capazes de infectar esta região e são infreqüentemente encontrados na região vulvar. Entretanto, em um estudo realizado por CAVALCANTI et al. (1997) através da hibridização molecular *in situ*, o HPV foi detectado em 68,5% dos casos de carcinoma escamoso invasivo cervical, sendo que 56,8% continham os tipos 16/18 e 35% o HPV 31/33/35 e enfatizam que a incidência destes últimos é maior no Brasil do que em outros países.

Com o advento das técnicas de hibridização molecular, a detecção do antígeno viral através da imuno-histoquímica foi gradualmente abandonada, por ser esta uma técnica menos sensível. São poucos os trabalhos que ainda utilizam este método para a identificação do HPV, sobretudo nas lesões invasoras e mais raramente ainda na região vulvar. No carcinoma invasivo do colo uterino, através da imuno-histoquímica a positividade varia entre 0-55,6% e está localizada em células isoladas nas áreas periféricas mais diferenciadas do tumor (HÖEPFNER & LÖNING, 1986; FIRZLAFF et al., 1988).

Na região vulvar, CRUM et al. (1982a) não detectaram o antígeno viral em nenhum caso e COSTA et al. (1990) em 33,3%. PARK et al. (1991b), estudando um caso de carcinoma invasivo basalóide e um do tipo condilomatoso, observaram positividade apenas neste último, em células isoladas nas áreas mais diferenciadas.

No nosso trabalho, o vírus estava presente em apenas quatro casos (7,3%), três localizados na área de NIV III e um nas células do tumor invasivo. Dois foram positivos apenas pela técnica da imuno-histoquímica, um somente através da hibridização molecular

*in situ* e um caso para ambos os métodos de detecção. Os dois casos positivos pela HIS continham somente o HPV tipo 16/18, semelhante aos achados da maioria dos estudos da literatura. As causas deste baixo índice de detecção viral através de ambas as técnicas, já foi discutido previamente no tópico das lesões intraepiteliais neoplásicas grau III.

Embora exista uma grande variabilidade nos índices de detecção do DNA viral no carcinoma escamoso invasivo vulvar, foram observadas diferenças importantes quanto às características clínicas, epidemiológicas, histopatológicas e virais nestas pacientes, podendo ser agrupadas em duas categorias distintas (ANDERSEN et al., 1991; TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1993, 1994; LEE et al., 1994; MONK et al., 1995; JONES et al., 1997; KAGIE et al., 1997a, 1997c; KOHLBERGER et al., 1998):

1. Pacientes mais jovens, fumantes, apresentando fatores de risco semelhantes aos do carcinoma cervical como: número de parceiros, idade do início da atividade sexual, história de verrugas genitais e de outras doenças sexualmente transmissíveis, baixo nível sócio-econômico e educacional. Frequentemente apresentam neoplasias multicêntricas no trato genital feminino inferior, lesões multifocais e NIV III associado. São geralmente do tipo histológico basalóide ou condilomatoso e 50 a 80% contem o DNA do HPV;
2. Mulheres mais velhas, com padrão histológico queratinizante usual, lesões unifocais e raramente contendo o HPV, detectado em 6,3-15% dos casos. Está frequentemente associado à hiperplasia escamosa ou líquen escleroso e não apresenta fatores de risco significantes.

Com o intuito de identificar lesões precursoras do carcinoma invasivo vulvar que poderiam ser detectadas histologicamente e tratadas precocemente impedindo assim o desenvolvimento da lesão invasora, começou-se a prestar mais atenção às alterações epiteliais adjacentes ao carcinoma invasivo. Foi observado que a maioria das pacientes possuem outras alterações epiteliais concomitantes, isoladas ou mistas e poucas, apenas cinco a 10%, não apresentam nenhum tipo de alteração (WOODRUFF, 1991; RUEDA et al., 1994a; TRIBBIA et al., 1995; JONES et al., 1997; KAGIE et al., 1997a, 1997c; McCONNELL et al., 1997; CARLSON et al., 1998), embora este índice tenha sido maior no trabalho de PINTO (1999), onde 27,3% das pacientes não tinham outras alterações no

epitélio vulvar adjacente. No trabalho de CARLSON et al. (1998), a maioria dos casos estava associada ao líquen simples crônico (82%) e menos freqüentemente à dermatite espongíotica e líquen plano.

### **3. 7. 11. Neoplasia intraepitelial vulvar**

Na literatura, a presença de NIV III adjacente à neoplasia invasora varia entre 10 a 70%, estando a maioria ao redor de 20 e 30%. A presença de NIV III adjacente à área de invasão está relacionada à pacientes de grupo etário mais jovem, à presença do HPV, de lesões multifocais e multicêntricas e com tipos histológicos específicos da neoplasia invasora, à semelhança dos resultados encontrados neste presente trabalho (HACKER et al., 1984; ANDERSEN et al., 1991; HØRDING et al., 1991; WOODRUFF, 1991; MITCHELL et al., 1993; KAGIE et al., 1997a, 1997c; McCONNELL et al., 1997).

Identificamos lesão de NIV III em 25,4% dos casos e estava associada a um grupo de pacientes com idade média mais jovem, 62,1 anos ( $p=0,07$ ), com a presença do HPV ( $p=0,04$ ), com o tipo histológico da neoplasia invasora ( $p=0,01$ ), com a presença ( $p=0,03$ ) e intensidade das alterações citopáticas virais ( $p=0,007$ ). Entretanto, não observamos relação com a presença de lesões multicêntricas e multifocais.

Pacientes contendo o vírus possuem idade média ao redor de 55 anos, contra a média de 70-77 anos do grupo negativo (TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1994; MONK et al., 1995; KAGIE et al., 1997c), embora alguns autores, como NUOVO et al. (1991b), MITCHELL et al. (1993) e PINTO (1999), não tenham observado diferenças entre os dois grupos de pacientes.

O índice de detecção viral está diretamente relacionado com a presença de NIV III, sendo positivo nestes casos em 60 a 100% e em apenas 6 a 13% daqueles onde a neoplasia intraepitelial vulvar grau III está ausente (HØRDING et al., 1991, 1993; NUOVO et al., 1991b; TOKI et al., 1991; KIM et al., 1996; KAGIE et al., 1997c).

Em nosso trabalho também encontramos relação entre a detecção do vírus e pacientes de grupo etário mais jovem ( $p=0,008$ ), com idade média de 46 anos e com a presença de NIV III, sendo que dos quatro casos onde o vírus estava presente, três continham neoplasia intraepitelial grau III adjacente. Entretanto, das 14 pacientes com NIV

III associado, apenas 21,4% foram positivas e somente 2,4% das 41 restantes. Esta baixa incidência pode ser resultante da sensibilidade do método empregado, entre outros fatores já previamente mencionados.

A presença de sinais histológicos de infecção viral no carcinoma invasivo vulvar é pouco freqüente, menor do que 10% (BORGNO et al., 1988; NUOVO et al., 1991b; HOTTA et al., 1994), embora alguns autores tenham observado índices entre 50 a 60% dos casos e relacionados com a idade mais jovem das pacientes e com a presença de NIV III adjacente (BUSCEMA et al., 1988; HUSSEINZADEH et al., 1991; RUEDA et al., 1994a). BORGNO et al. (1988) encontraram baixos índices de alterações histológicas sugestivas de infecção viral e em proporções semelhantes entre os grupos contendo lesões de NIV III e distróficas, respectivamente, 4,5% e 6,3%.

A intensidade das alterações virais nas lesões benignas e malignas da vulva difere da cérvix uterina. Isto talvez seja secundário ao maior grau de diferenciação do epitélio escamoso vulvar, gerando dificuldades em se estimar a presença e o grau de coilocitose nesta região, mesmo entre os patologistas mais experientes (VOOG, 1996). Será que a coilocitose é sempre indicativa de infecção viral, ou existem outras explicações para estas alterações? Seriam estas variações normais do epitélio vulvar, incorrendo no risco de diagnósticos falso-positivos nesta região?

Em nosso trabalho, sinais histológicos sugestivos de infecção viral estavam presentes em muitos casos (54,5%), a maioria (70%) de grau leve e associada à idade média mais jovem das pacientes, 64,8 anos ( $p=0,05$ ). Entretanto, se considerarmos estas alterações de grau leve como falso-positivas e com resultado negativo, este número cai para 16,4%, em concordância com os estudos de BORGNO et al. (1988), NUOVO et al. (1991b) e HOTTA et al. (1994) e neste caso, estava relacionado com o tipo de alteração presente no epitélio adjacente ( $p<0,0001$ ) e com a detecção do vírus ( $p=0,02$ ).

SAGERMAN et al. (1996) referem que lesões desprovidas de alterações histológicas de infecção viral raramente apresentam reação positiva através da técnica da hibridização molecular *in situ*, sendo necessária a utilização de métodos mais sensíveis. MIWA et al. (1995), estudando o carcinoma invasor da cérvix uterina através da técnica da hibridização molecular *in situ*, detectaram o HPV em apenas 59% dos casos contendo alterações coilocitóticas.

A presença do HPV e de NIV III está associada a variantes específicas do carcinoma escamoso invasivo. O HPV é detectado em 0 a 30% dos carcinomas invasivos queratinizantes, a maioria associada à presença concomitante das variantes basalóide ou condilomatosa da neoplasia, ou de NIV III. Nos tipos basalóide e condilomatoso, este índice é de 70 a 100% dos casos (TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1994, MONK et al., 1995; KIM et al., 1996; TRIMBLE et al., 1996).

TOKI et al. (1991), através da reação em cadeia da polimerase, encontraram reação positiva em 37,5% dos carcinomas basalóides, 100% dos condilomatosos e em 10,5% dos queratinizantess. PINTO (1999) em 42,1%, 52,6% e 17,1%, respectivamente. Este autor refere que a presença do vírus estava associada aos subtipos histológicos basalóide e condilomatoso e também, com a presença de NIV no epitélio adjacente.

MONK et al. (1995) identificaram o DNA viral em 39% dos carcinomas com o padrão usual e enfatizam que não é possível diferenciar histologicamente os tumores que apresentarão ou não o vírus.

KAGIE et al. (1997b, 1997c) não encontraram diferença estatística entre estas variantes histológicas, respectivamente, 14% para a variante usual e 24% para os padrões condilomatoso e basalóide.

Dentre os quatro casos positivos do nosso trabalho, três eram da variante basalóide e um, padrão usual. A incidência de associação entre NIV III e os carcinomas basalóide e condilomatoso é semelhante ao da detecção viral, embora a presença de NIV III seja mais baixa nas pacientes com carcinoma queratinizante padrão usual, entre zero e 10% (TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1994; KIM et al., 1996; TRIMBLE et al., 1996). Entretanto, KAGIE et al. (1997a, 1997c) não observaram relação entre a presença de NIV III com os subtipos histológicos da neoplasia invasora.

Normalmente o padrão histológico de NIV III adjacente é semelhante ao da neoplasia invasora, embora possam ser diferentes ou mistas (PARK et al., 1991a; TOKI et al., 1991; KURMAN et al., 1993; HØRDING et al., 1994).

Entre os subtipos de NIV III identificados, a maioria, 73 a 100% dos casos, é da variante basalóide ou condilomatosa, enquanto que o diferenciado, ocorre em uma

freqüência de 0 a 27% (RUEDA et al., 1994a; KAGIE et al., 1997a; CARLSON et al., 1998). BECKMANN et al. (1991) consideram este último tipo como uma lesão mais agressiva e com progressão mais rápida para neoplasia invasora. Entretanto, deve ser salientado que em vários casos, a classificação de acordo com as regras estabelecidas pela ISSVD não é possível e o diagnóstico da variante diferenciada é difícil, sendo muitas vezes caracterizada como lesão reativa não neoplásica ou como NIV I (HAEFNER et al., 1995; JONES et al., 1997). Parece também que as lesões de NIV I e NIV II são pouco diagnosticadas nos casos de carcinoma escamoso invasivo, talvez por passarem despercebidas. Nos trabalhos de NUOVO et al. (1991b); KAGIE et al. (1997c) e CARLSON et al. (1998), NIV I foi detectado em 0%, 59% e 13,3% dos casos e NIV II em 0%, 15% e 18,3%, respectivamente.

Identificamos 14 casos de NIV III, sendo nove no grupo de pacientes contendo o carcinoma invasivo queratinizante e em cinco com o padrão basalóide. Embora a maioria dos casos esteja no grupo usual, considerando-se o número total destas lesões, a incidência foi de 20,9%; no padrão basalóide, 83,3% das pacientes tinham NIV III adjacente, diferença significativa do ponto de vista estatístico ( $p=0,01$ ). O número de casos de carcinoma usual com lesão de NIV associada foi maior do que os valores encontrados por TOKI et al. (1991), HØRDING et al. (1994), KIM et al. (1996), e TRIMBLE et al. (1996).

Não encontramos relação entre o tipo histológico da neoplasia intraepitelial vulvar grau III e da neoplasia invasora, e a maioria, como nos outros trabalhos, era NIV III do tipo bowenóide ou basalóide. Embora não tenhamos identificado nenhum caso como padrão diferenciado, a sua incidência é relativamente baixa na literatura (RUEDA et al., 1994a; KAGIE et al., 1997a; CARLSON et al., 1998).

NIV I e NIV II estavam presentes respectivamente em 12,7% e 5,4% dos casos, valores próximos aos encontrados por NUOVO et al. (1991b) e CARLSON et al. (1998). Todos aqueles contendo NIV I estavam associados a lesões distróficas. Dentre os três casos com NIV II, dois tinham alterações distróficas e um, líquen simples crônico.

A detecção do HPV, a presença de NIV III e as variantes histológicas específicas do carcinoma invasivo também estão associadas à presença de lesões multifocais e multicêntricas, sugerindo um efeito de campo e agente etiológico comum, envolvendo múltiplos locais do trato genital inferior (HUSSEINZADEH et al., 1991;

HØRDING et al., 1993, 1994; KURMAN et al., 1993; MITCHELL et al., 1993; MAJEWSKI & JABLONSKA, 1997). Em nosso estudo, apenas a detecção do vírus estava relacionada a lesões multicêntricas e nenhuma variável à presença de lesões multifocais.

No colo uterino, 80 a 100% das neoplasias invasoras contém neoplasia intraepitelial cervical adjacente e o papilomavírus humano e já foi estabelecido o papel direto deste vírus na origem e progressão destas lesões (TOKI et al., 1991). A alta incidência de HPV e NIV III, os quais estão relacionados aos tipos específicos de carcinoma invasivo vulvar basalóide e condilomatoso, onde estas pacientes são mais jovens do que as com o carcinoma usual e apresentam fatores de risco semelhantes ao do carcinoma cervical, indicam que NIV III é precursora destas lesões invasoras e o HPV é o agente etiológico responsável pela origem de ambas, pelo menos neste grupo de mulheres em particular (ANDERSEN et al., 1991; TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; HØRDING et al., 1993; KURMAN et al., 1993; TRIMBLE et al., 1996; KOHLBERGER et al., 1998).

Embora faltem estudos prospectivos de grande escala em pacientes contendo lesões de NIV III não tratada, parece que a progressão para invasão é baixa, entre 5 a 20% (CRUM & BURKETT, 1989; HØRDING et al., 1991, 1994, 1995; KAGIE et al., 1997c) e ocorre principalmente em pacientes mais idosas, ou em mulheres mais jovens e imunodeprimidas e naquelas com lesões localizadas na região anal, cuja zona de transformação responderia à infecção viral de modo semelhante à da cérvix uterina (HØRDING et al., 1991; WOODRUFF, 1991; CRUM, 1992; RIDLEY, 1994). CRUM (1992) e HAEFNER et al. (1995) identificaram foco de neoplasia invasora, respectivamente, em 19% e 23% das lesões de NIV III ressecadas.

HAEFNER et al. (1995) notaram diferença significativa entre as idades médias das pacientes com NIV III e aquelas contendo NIV III associada ao carcinoma invasivo, respectivamente, 45,8 e 58,4 anos. Embora algumas mulheres apresentem outras doenças imunossupressoras que poderiam contribuir para a progressão neoplásica, isto não está uniformemente presente em todos os casos (MESSING & GALLUP, 1995).

Alguns fatos interessantes devem ser ressaltados:

- JONES et al. (1997), observaram em anos mais recentes, um aumento na incidência do carcinoma invasivo basalóide e condilomatoso, sobretudo em pacientes mais jovens e relacionado ao incremento das lesões de NIV III e da infecção por HPV;

- outros autores relatam que, apesar do aumento na incidência de NIV III, o carcinoma invasivo permaneceu estável e poderia ser explicado como:
- # lesões de NIV III morfológicamente semelhantes podem ter comportamento clínico distintos, não sendo possível identificar as lesões que são estáveis daquelas que irão regredir ou progredir, apenas com a utilização de critérios citológicos, histológicos, ou clínicos (KAGIE et al., 1997a, 1997c);
  - # o carcinoma invasivo se desenvolve durante um período de tempo muito longo e os efeitos do aparente incremento da infecção por HPV no desenvolvimento do carcinoma invasivo ainda não tiveram tempo de ocorrer (TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1994; JONES et al., 1997);
  - # lesões de NIV III e carcinoma invasivo são etiológicamente distintas (STURGEON et al., 1992).
- embora o diagnóstico histológico seja o mesmo, o carcinoma invasivo em mulheres jovens têm etiologia, fatores de risco e história natural diferente das pacientes mais velhas, ou apresentam uma história evolutiva mais acelerada por algum motivo ainda desconhecido (COSTA et al., 1995; MESSING & GALLUP, 1995);
- mesmo em pacientes com NIV III ou carcinoma invasivo das variantes basalóide e condilomatosa, não é possível detectar o HPV em todos os casos, lembrando que mesmo dentro de cada grupo morfológico, existem subgrupos que são HPV positivos e outros, negativos (MITCHELL et al., 1993);
- ROMAN et al. (1991) relatam a presença de carcinoma invasivo em três pacientes com idades variando entre 16 e 25 anos, lembrando da existência desta doença também em pacientes jovens, embora rara e enfatizam a necessidade de se biopsiar sempre toda e qualquer lesão vulvar suspeita inclusive neste grupo etário. Além disso, CHOO (1982) referem que o estágio clínico e o curso da doença é semelhante nas pacientes jovens e naquelas mais idosas.

Em nosso trabalho, em concordância com a literatura, encontramos lesão de NIV III adjacente à neoplasia invasora em 25,4% dos casos e associada à idade média mais jovem, à presença de alterações coilocitóticas e à detecção do HPV. Ao contrário da maioria dos trabalhos que correlacionam estes achados às variantes basalóide e condilomatosa, observamos significância estatística apenas para o tipo basalóide. Assim, para nós, apenas esta variante parece estar relacionada à origem viral.

Do total de quatro pacientes com o padrão condilomatoso, apenas uma tinha menos de 60 anos, duas tinham coilocitose leve e moderada, todas estavam associadas a lesões distróficas e nenhuma a NIV III ou reação positiva para o HPV. No padrão basalóide (total de seis pacientes), quatro tinham menos de 60 anos, quatro coilocitose moderada, cinco NIV III e em três casos detectou-se o HPV.

Entretanto, algumas particularidades advindas da observação dos diferentes trabalhos publicados, apontam para um outro grupo distinto de lesões neoplásicas invasoras da vulva, sugerindo assim a presença de outros fatores patogênicos que não a infecção por HPV e NIV.

A presença de características clínico-patológicas distintas entre o carcinoma invasivo cervical e vulvar como a idade média e a presença de neoplasia intraepitelial adjacente, sugere que talvez o HPV tenha um papel diferente em ambas as regiões. Entre as explicações possíveis para estas diferenças estão (MENCZER et al., 1982; MABUCHI et al., 1985; BRINTON et al., 1990; BECKMANN et al., 1991; TOKI et al., 1991; MILDE-LANGOSCH et al., 1995):

- a resposta do colo uterino e da vulva a um mesmo estímulo varia com a idade da paciente;
- a resposta do colo a uma agressão é mais rápida do que na vulva devido às características inerentes à zona de transformação;
- a presença de estímulo carcinogênico adicional em grupos etários mais velhos, onde a região vulvar é mais responsiva do que a cérvix uterina;
- embora várias regiões do trato genital feminino inferior tenham o mesmo insulto inicial, talvez existam fatores de risco específicos que diferenciem quais as mulheres que eventualmente desenvolverão um ou outro tipo de câncer em determinada localização do trato genital feminino inferior.

O argumento que tenta explicar o baixo índice de detecção viral nos carcinomas invasivos vulvares, embora o HPV seja considerado como um fator etiológico importante, é o de que ele atuaria através de mecanismos heterogêneos em regiões distintas onde (IWASAWA et al., 1997):

- na região vulvar, o HPV produziria um estímulo mitógeno nos estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico, mas a sua presença ou expressão não seria mais necessária nas fases mais tardias, embora em alguns casos o genoma viral poderia permanecer e os oncogenes virais estarem ativos, porque outros eventos adicionais ocorreriam na célula alterando permanentemente o controle do crescimento celular;
- no colo uterino, seria necessária a presença e a expressão contínua dos oncogenes virais. Entretanto, existem casos onde o HPV não é detectado;
- certos carcinomas vulvares estariam associados a tipos virais menos conhecidos e portanto, não seriam detectados pelas sondas atualmente disponíveis;
- o HPV não seria co-fator relacionado à patogênese do carcinoma vulvar, mas somente passageiros locais.

Assim, como parece que existem dois grupos distintos de lesões intraepiteliais neoplásicas vulvares grau III, um relacionado com a infecção pelo HPV e outro independente dela, isto também poderia ser aplicado ao carcinoma invasor (EDWARDS et al., 1996). Além disso, é discutível se todas as lesões invasivas se originam a partir de uma fase intraepitelial e parece que na vulva não existe necessariamente uma progressão contínua e uniforme entre os estágios pré-malignos NIV I, II e III (EDWARDS et al., 1996; KAGIE et al., 1997a).

A maioria dos casos de carcinoma escamoso invasivo vulvar ocorrem em pacientes mais idosas, são predominantemente do tipo queratinizante usual e não estão relacionados ao NIV. Além disso, a detecção do HPV é baixa, sendo que cerca de 70% das lesões não contém o vírus (NUOVO et al., 1991b; CRUM, 1992; STURGEON et al., 1992; KURMAN et al., 1993; COSTA et al., 1995; MESSING & GALLUP, 1995; PINTO, 1999).

A observação de que o carcinoma cervical está relacionado ao HPV e a sua incidência é menor em mulheres judias quando comparadas com as norte-americanas, embora o carcinoma invasivo vulvar tenha distribuição semelhante (MENCZER et al., 1982; MABUCHI et al., 1985; PIURA et al., 1998), além da baixa detecção do vírus, do predomínio da variante usual e da maior incidência do carcinoma vulvar nos grupos de

pacientes mais idosas, levaram à investigação de outras possíveis variáveis envolvidas na etiopatogenia destas lesões (TOKI et al., 1991; HIETANEN et al., 1995b). BRINTON et al. (1990) não conseguiram estabelecer o papel do HPV como agente causal no desenvolvimento do carcinoma invasivo vulvar. Trabalhos epidemiológicos e histopatológicos que confirmem ou refutem a idéia de doença sexualmente transmissível em mulheres mais velhas continuam inconclusivos (CRUM, 1992).

### ***3. 7. 12. Doenças inflamatórias e lesões distróficas vulvares***

A coexistência freqüente de doenças inflamatórias crônicas vulvares e distróficas e a sua relação topográfica com o carcinoma invasivo vulvar, levantou a hipótese de que estas desordens poderiam ser consideradas como precursores análogos às lesões de NIV III e responsáveis pelo desenvolvimento neoplásico na maioria dos casos.

A presença de alterações epiteliais concomitantes indica que estas condições ou são lesões precursoras do carcinoma, ou são resultantes de uma reação local ao mesmo estímulo crônico que originou o carcinoma (TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; MITCHELL et al., 1993; JONES et al., 1997; KAGIE et al., 1997c; CARLSON et al., 1998).

Embora a coexistência de ambos não seja uma prova definitiva de que o carcinoma se origina do líquen e os estudos retrospectivos não provêm informações seguras sobre a sua progressão para o carcinoma invasivo, CARLSON et al. (1998) observaram uma relação topográfica entre ambos na maioria dos casos, e a presença de áreas múltiplas de neoplasia invasora em um fundo de líquen.

Estudos prospectivos de pacientes contendo líquen mostram que menos de 5% delas desenvolvem neoplasia invasora, com uma duração media de cerca de dez anos (CRUM, 1992; ANSINK et al., 1994; TAN et al., 1994; ACOG, 1998). CARLSON et al. (1998), em um trabalho com 32 pacientes contendo líquen e com 17 anos de seguimento, observaram que 9% desenvolveram NIV e 21% carcinoma escamoso invasor. CHOO (1982), BORGNO et al. (1988), CRUM (1992), RUEDA et al. (1994a), SAGERMAN et al. (1996) e CARLSON et al. (1998), referem que as lesões contendo hiperplasia escamosa e atipias, isto é, NIV em graus variáveis, associadas ao líquen, apresentam maior risco, indicando um processo semelhante ao NIV.

Apesar dos trabalhos da literatura mostrarem uma forte associação entre o líquen e o carcinoma invasor (CRUM, 1992; RIDLEY, 1994; TRIBBIA et al., 1995; CARLSON et al., 1998), o papel destas lesões no desenvolvimento do câncer ainda não está claro e não é universalmente aceito (NEILL et al., 1990; SAGERMAN et al., 1996). A discordância entre a frequência e o significado destas alterações é secundário à:

- presença de poucas informações devido à raridade do carcinoma vulvar;
- utilização de terminologia confusa e imprecisa, sobretudo em trabalhos mais antigos;
- estudo inadequado do espécime e conseqüentemente, ausência do reconhecimento e diagnóstico destas lesões;
- dificuldade no seu diagnóstico clínico e;
- presença de alterações histopatológicas em pacientes assintomáticas e vice-versa (RIDLEY, 1994; GILES & KNEALE, 1995; TRIBBIA et al., 1995; CARLSON et al., 1998).

Atualmente, as desordens epiteliais não neoplásicas da vulva são classificadas de acordo com o preconizado pela ISSVD em 1987 (WILKINSON, 1990; ACOG, 1998) como: hiperplasia escamosa, líquen escleroso e outras dermatoses. A hiperplasia escamosa associada ao líquen escleroso está dentro do espectro de alterações do líquen, devendo ser reportado no laudo as duas condições. As lesões apresentando diferentes graus de atipias foram enquadradas dentro das neoplasias intraepiteliais.

O líquen escleroso é uma doença crônica que acomete ambos os sexos e qualquer faixa etária, mas ocorre predominantemente em mulheres pré-púberes e pós-menopausadas, com forte predileção para as áreas genitais (CARLI et al., 1991; TAN et al., 1994; SAGERMAN et al., 1996; ACOG, 1998).

A sua incidência e etiologia são desconhecidas. É reportado em alguns pacientes uma predisposição familiar e genética do tipo HLA e associação com fatores hormonais como baixo nível de hidrotosterona e androstenediona, com fatores enzimáticos e imunes, como níveis aumentados de auto-anticorpos séricos (CARLI et al., 1991; ACOG, 1998). CARLI et al. (1991) identificaram um aumento do número de células

de Langerhans em pacientes com líquen, indicando uma ativação persistente destas células intra-epidérmicas apresentadoras de antígenos, sugerindo assim um possível envolvimento do sistema imune da pele na patogênese desta lesão.

TAN et al. (1994), avaliando a atividade proliferativa do líquen, observaram níveis baixos do antígeno MIB (Ki-67) e altos de p53, contradizendo estudos anteriores que demonstravam uma atividade metabólica maior do epitélio, considerando-o como hiperproliferativo.

A hiperplasia escamosa é caracterizada por um espessamento do epitélio secundário à proliferação de células epiteliais típicas e desprovidas de outras alterações morfológicas que a classifique como outras dermatoses específicas, sendo, portanto, um diagnóstico de exclusão (ACOG, 1998). Também possui patogênese desconhecida e é considerada como uma resposta do epitélio vulvar a vários estímulos, alguns ainda não identificados (BORGNO et al., 1988; SAGERMAN et al., 1996).

A maioria dos trabalhos mostra que as lesões distróficas em geral estão associadas ao carcinoma invasivo vulvar em cerca de 40 a 65% dos casos (Tabela 33).

A incidência do líquen escleroso varia entre 3 e 70%, com média ao redor de 20%; na hiperplasia escamosa está entre 30 e 65%, com média de 45% e na distrofia mista, entre 11 e 20% (Tabela 33), sendo a hiperplasia escamosa mais freqüente do que o líquen (WOODRUFF, 1991; RUEDA et al., 1994a; McCONNELL et al., 1997; PINTO, 1999).

Atipias epiteliais estão presentes em cerca de 25% das lesões distróficas associadas ao carcinoma invasor, sendo a maioria associada à hiperplasia escamosa. Em contrapartida, a freqüência de atipias em lesões distróficas desprovidas de lesão invasora está ao redor de 10% (BORGNO et al., 1988; CRUM & BURKETT, 1989; TOKI et al., 1991).

TABELA 33

**Incidência e tipos de alterações encontradas no epitélio adjacente ao carcinoma invasivo da vulva em diferentes trabalhos da literatura**

| Autor                   | Padrão histológico da neoplasia (nº de casos) | Alterações encontradas no epitélio adjacente ao carcinoma invasivo |                      |                  |                      |            |   |
|-------------------------|---|--|----------------------|------------------|----------------------|------------|---|
|                         |   | Sem alterações   | Hiperplasia escamosa | Líquen escleroso | Hiperplasia e líquen | NIV III    | NIV III e distrofia   |
| TOKI et al. (1991)      | Total=30 casos                                | 4 (13,3%)  | 12 (40%)             | -                | 2 (6,7%)             | 12 (40%)   | -   |
|                         | U=19 (63,3%)                                  | 3 (15,8%)  | 12 (63,2%)           | -                | 2 (10,5%)            | 2 (10,5%)  | -   |
|                         | B=8 (26,7%)                                   | 1 (12,5%)  | 0                    | -                | 0                    | 7 (87,5%)  | -   |
|                         | C=3 (10%)                                     | 0  | 0                    | -                | 0                    | 3 (100%)   | -   |
| WOODRUFF (1991)         | Total=20 casos                                | 1 (5%)   | 12 (60%)             | 1 (5%)           | -                    | 6 (30%)    | -   |
| KURMAN et al. (1993)    | U   | 3,2%   | 83%                  | -                | -                    | 13,8%      | -   |
|                         | B/C   | 6%   | 17%                  | -                | -                    | 77%        | -   |
| HØRDING et al. (1994)   | Total=78 casos                                | -  | 8 (10,2%)            | 36 (46,1%)       | -                    | 21 (26,9%) | -   |
|                         | U=51 (65,4%)                                  | -  | 6 (11,8%)            | 36 (70,6%)       | -                    | 0          | -   |
|                         | B=10 (12,8%)                                  | -  | 1 (10%)              | 0                | -                    | 8 (80%)    | -   |
|                         | C=17 (21,8%)                                  | -  | 1 (5,9%)             | 0                | -                    | 3 (76,5%)  | -   |
| RUEDA et al. (1994a)    | Total=64 casos                                | 11%  | 31%                  | 9%               | 19%                  | 30%        | NIV D: 100% c/ D.M.   |
|                         |   |  |                      |                  |                      |            | NIV B/C: 69% c/ líquen e 94% c/ hiperplasia   |
| TRIBBIA et al. (1995)   | Total=37 casos                                | 11%  | -                    | 11%              | 13%                  | 30%        | NIV D: 35% c/ líquen  |
| KIM et al. (1996)       | Total=18 casos                                | 3 (16,7%)  | 9 (50%)              | 2 (11,1%)        | -                    | 4 (22,2%)  | -   |
|                         | U=14 (77,8%)                                  | 2 (14,3%)  | 9 (64,3%)            | 2 (14,3%)        | -                    | 1 (7,1%)   | -   |
|                         | B=3 (16,7%)                                   | 1 (33,3%)  | 0                    | 0                | -                    | 2 (66,7%)  | -   |
|                         | C=1 (5,5%)                                    | 0  | 0                    | 0                | -                    | 1 (100%)   | -   |
| TRIMBLE et al. (1996)   | Total=70 casos                                | 30 (42,9%)   | 20 (28,6%)           | 10 (14,3%)       | -                    | 19 (27,1%) | -   |
|                         | U=48 (68,6%)                                  | 30 (62,5%)   | 16 (33,3%)*          | 9 (18,8%)*       | -                    | 2 (4,2%)   | -   |
|                         | B/C=22 (31,4%)                                | 0  | 4 (18,2%)            | 1 (4,5%)         | -                    | 17 (77,3%) | -   |
| McCONNELL et al. (1997) | Total=116 casos                               | 18 (15,5%)   | 43 (37,1%)           | 3 (2,6%)         | 19 (16,4%)           | 14 (12,1%) | NIV - não especificado<br>-11,2% c/ hiperplasia<br>- 0,9% c/ líquen<br>- 4,3% c/om D.M. |
| CARLSON et al. (1998)   | Total=60 casos                                | 5 (8,3%)   | -                    | 31 (51,7%)       | -                    | 14 (23,3%) | 13,3% c/ líquen<br>(2 NIV B/C e 6 NIV D)  |
| <b>Nosso trabalho</b>   | Total=55 casos                                | 6 (10,9%)  | 16 (29,1%)           | 5 (9,1%)         | 12 (21,8%)           | 8 (14,5%)  | 6 (10,9%)   |
|                         | U=43 (78,2%)                                  | 5 (11,6%)  | 13 (30,2%)           | 3 (7%)           | 11 (25,6%)           | 3 (7%)     | 6 (13,9%)   |
|                         | B=6 (10,9%)                                   | 0  | 1 (16,7%)            | 0                | 0                    | 5 (83,3%)  | 0   |
|                         | C=4 (7,3%)                                    | 0  | 2 (50%)              | 1 (25%)          | 1 (25%)              | 0          | 0   |
|                         | V=2 (3,6%)                                    | 1 (50%)  | 0                    | 1 (50%)          | 0                    | 0          | 0   |

c/ = com (-) = não referido U = usual B = basalóide C = condilomatoso V = verrucoso

NIV = NIV III (neoplasia intraepitelial vulvar grau III) D = variante diferenciada

D.M. = distrofia vulvar mista (líquen escleroso e hiperplasia escamosa)

\* vários casos apresentavam hiperplasia associada ao líquen, porém não foram discriminados pelo autor

Em concordância com a literatura, encontramos lesões distróficas adjacentes à neoplasia invasora em 60% dos casos, assim distribuídas: hiperplasia escamosa em 29%, distrofia mista em 21,8% e 9,1% de líquen escleroso. Destes, nove (27,3%) apresentavam atipias celulares, sendo quatro em lesões distróficas mistas e cinco em hiperplasias

escamosas, duas de grau moderado e sete com atipias leves. Devemos ressaltar a dificuldade de se diferenciar as atipias leves daquelas de padrão reacional, pois, estas lesões são freqüentemente pruriginosas, induzindo à alterações inflamatórias associadas.

A proporção de pacientes com carcinoma invasivo vulvar contendo no epitélio adjacente, lesões de NIV III e distróficas, está altamente relacionada com a variante histológica da neoplasia invasora, bem como com o tipo de NIV III. Assim, NIV III basalóide e condilomatoso estão presentes em cerca de 70 a 90% dos carcinomas invasivos de padrão basalóide e condilomatoso e em 5 a 14% dos carcinomas queratinizantes usuais. Inversamente, lesões distróficas ocorrem em cerca de 75% dos casos com o padrão usual e em até 20% das variantes basalóide e condilomatosa (TOKI et al., 1991; KURMAN et al., 1993; HØRDING et al., 1994; KIM et al., 1996; TRIMBLE et al., 1996; CARLSON et al., 1998). NIV III diferenciado está associado mais freqüentemente ao carcinoma invasivo usual e à distrofia (RUEDA et al., 1994a; TRIBBIA et al., 1995; CARLSON et al., 1998). Por outro lado, as variantes basalóide e condilomatosa de NIV III são mais comumente encontradas nas hiperplasias escamosas, em 70 a 94% dos casos (RUEDA et al., 1994a; McCONNELL et al., 1997).

Os nossos resultados foram um pouco diferentes de alguns trabalhos. NIV III estava associada a apenas 50% dos casos de carcinoma invasivo de padrão basalóide ou condilomatoso e em 20,9% da variante queratinizante usual. Entretanto, se analisarmos as duas primeiras variantes em separado, observamos que 83,3% dos casos com a variante basalóide e nenhum dos condilomatosos, estavam associados ao NIV III; lesões distróficas estavam presentes em 16,7% e 100%, respectivamente.

Encontramos uma porcentagem discretamente mais elevada de NIV III associada ao carcinoma usual. Em concordância com a literatura, 62,8% dos casos com esta variante de carcinoma invasivo apresentavam lesões distróficas adjacentes.

A ausência de NIV III diferenciado na nossa casuística, talvez se deva à dificuldade do seu diagnóstico, tendo sido interpretado provavelmente como alterações celulares reativas secundárias à inflamação, ou como neoplasia intraepitelial grau I.

Deve-se notar que o carcinoma invasivo pode apresentar também lesões de NIV III e líquen concomitantemente, em uma freqüência de cinco a 95%, sendo que na maioria

dos trabalhos esta associação é baixa, entre cinco e 17% (TRIBBIA et al., 1995; KAGIE et al., 1997c; McCONNELL et al., 1997; CARLSON et al., 1998), embora RUEDA et al. (1994a) tenham encontrado uma incidência de 95%, predominantemente nos casos com hiperplasia escamosa. No estudo de CARLSON et al. (1998), NIV III estava presente mais freqüentemente nos casos de líquen associado ao carcinoma invasivo, do que naqueles contendo líquen e desprovidos de neoplasia invasora, respectivamente, 44% e 6%.

Em nosso trabalho, lesões de NIV III e distróficas concomitantes ocorreram em apenas seis casos (10,9%), em concordância com a maioria dos trabalhos (RUEDA et al., 1994a; TRIBBIA et al., 1995; KAGIE et al., 1997c; McCONNELL et al., 1997; CARLSON et al., 1998). Entretanto, não houve predominância no grupo de hiperplasia, sendo que três apresentavam hiperplasia escamosa e outros três, distrofia mista ou líquen. É interessante notar que apenas uma paciente neste grupo tinha menos do que 60 anos de idade e NIV III de padrão bowenóide; no restante, era NIV da variante basalóide. Em todas o carcinoma invasor era da variante usual, e em nenhuma se detectou o HPV. Ao contrário, das pacientes contendo somente lesões de NIV III (oito casos), cinco tinha menos de 60 anos, cinco a variante basalóide da neoplasia invasora e em três foi detectado o vírus do HPV; três apresentavam NIV III basalóide e cinco o padrão bowenóide.

A partir destas observações, é questionado se o grupo de pacientes contendo NIV III e líquen concomitantemente seria do ponto de vista etiológico, distinto daquele com lesão de NIV III não associado à distrofia. Esta pergunta não pode ser respondida em nosso trabalho devido ao pequeno número de casos.

Estudos com casos-controle mostram que a presença de historia de leucoplasia e inflamação é fator de risco significativo no desenvolvimento do câncer vulvar e ocorre freqüentemente em mulheres idosas (ANDERSEN et al., 1991; NUOVO et al., 1991b; JONES et al., 1997; McCONNELL et al., 1997). Os mecanismos pelos quais estas alterações epiteliais benignas desenvolvem carcinoma não são bem conhecidos e provavelmente envolvem alterações seqüenciais do epitélio produzidas por eventos celulares endógenos (TATE et al., 1997).

Em outros sítios cutâneos, tem sido bem documentado que os processos inflamatórios crônicos irritativos estão associados ao desenvolvimento do carcinoma invasor (RIDLEY, 1994; SAGERMAN et al., 1996; CARLSON et al., 1998). A hiperplasia

escamosa mostra sobreposição com a histologia do líquen simples crônico, condição secundária a ação de agentes químicos, bacterianos ou fúngicos, sendo que alguns consideram ambas como condições relacionadas. É relatado na literatura o desenvolvimento de carcinoma em lesões cutâneas ulceradas de longa data e em dermatoses com fibrose secundária, como nas cicatrizes de queimaduras antigas, epidermólise bolhosa, acne vulgar, hidradenite supurativa e poiquilodermia, entre outros.

Embora as distrofias vulvares tenham sido consideradas como desordens de origem nutricional, metabólica, degenerativa, ou de crescimento aberrante, numerosos estudos têm demonstrado uma etiologia inflamatória, com ativação persistente das células apresentadoras de antígenos e de células linfóides em todas as fases evolutivas do líquen e contendo elementos de cicatrização, uma vez que a esclerose é também uma forma de fibrose. As lesões distróficas são capazes de causar irritação crônica e podem agir como iniciadores ou como promotores da carcinogênese (BORGNO et al., 1988; RUEDA et al., 1994a; CARLSON et al., 1998).

Assim, a ligação entre líquen e carcinogênese parece ser através do fenômeno bem conhecido de inflamação crônica e cicatrização, dando origem à neoplasia (CARLSON et al., 1998). Entretanto, nenhum caminho precursor bem definido que induza ao acúmulo de alterações genéticas terminando em carcinoma foi ainda comprovado.

A epiderme do líquen mostra um fenótipo regenerativo crônico, com desarranjo da arquitetura cutânea por ativação metabólica crônica e alteração no padrão de crescimento dos queratinócitos. A cronicidade predispõe à iniciação neoplásica por aumentar as chances de danos genéticos e conseqüentemente permitir a progressão tumoral, sendo que o dano ao genoma levando à instabilidade cromossômica é manifestado pela presença da proliferação de queratinócitos atípicos (NIV III diferenciado), aneuploidia do DNA e imunodeteção da proteína p53 (CARLSON et al., 1998).

CARLSON et al. (1998) relatam a presença de expansão clonal e aneuploidia nas lesões de líquen contendo ou não carcinoma invasor associado, indicando uma possível progressão neoplásica, ou uma característica freqüentemente associada ao carcinoma localizado na região do líquen. No estudo de van HOEVEN & KOVATICH (1996), 25% das lesões de líquen eram aneuplóides

Além disso, o infiltrado inflamatório e seus mediadores como os radicais livres que acompanham estas lesões, também podem servir como fontes endógenas de mutagênicos, causando dano ao DNA e mutação (CARLSON et al., 1998).

Fora do trato genital, o líquen parece não ter potencial maligno. TAN et al. (1994) demonstraram que na região vulvar havia índices maiores de imunodeteção da proteína p53 e menor de MIB (Ki-67) quando comparados com sítios extragenitais, sugerindo que o líquen tenha um papel e comportamento biológico diferente no desenvolvimento do carcinoma nestas localizações.

Na hiperplasia escamosa, estes achados são contraditórios. KIM et al. (1996) e CARLSON et al. (1998) encontraram policlonalidade, indicando um processo reativo e não um precursor neoplásico do carcinoma. Assim, esta entidade poderia ser simplesmente o reflexo das alterações epiteliais em resposta à lesão invasora ou à irritação e inflamação crônicas.

TATE et al. (1997) estudaram o padrão de clonalidade em epitélio vulvar normal, nas lesões de NIV e nas hiperplasias escamosas e identificaram o padrão policlonal em 83,3% dos casos com epitélio normal e padrão monoclonal em 87,5% das lesões de NIV, 50% das hiperplasias escamosas e em 100% dos casos de líquen (os quais eram apenas dois casos). Embora este trabalho não indique se o padrão monoclonal é relevante para o risco de desenvolver câncer nestes casos, ele mostra que a expansão clonal pode ocorrer na ausência ou preceder o fenótipo neoplásico de NIV.

PINTO et al. (2000), analisando lesões distróficas (hiperplasia escamosa e líquen escleroso) e neoplasia intraepitelial vulvar grau III, verificaram que é comum a presença de instabilidade cromossômica nestas lesões e sugerem que há um aumento progressivo destas instabilidades na progressão da mucosa normal para neoplasia intraepitelial. Estes achados podem indicar que estas lesões contendo instabilidade alélica possuem risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias invasivas.

Assim, parece que uma diversidade de condições pré-neoplásicas podem coexistir com o líquen, algumas como, por exemplo, NIV III, identificáveis à microscopia óptica, enquanto que outras, apenas através de testes especiais como a análise do conteúdo do DNA (CARLSON et al., 1998).

Estudos relacionando a presença do HPV em lesões distróficas são escassos e contraditórios. KAGIE et al. (1997c) não detectaram o vírus em nenhum caso de líquen e SAGERMAN et al. (1996) e van HOEVEN & KOVATICH (1996), em 66,7% e 20%, respectivamente.

A maioria dos estudos não conseguiu identificar o vírus nas lesões de carcinoma invasivo associado ao líquen, mesmo com a utilização de técnicas mais sensíveis de detecção como o PCR, indicando que o HPV não está implicado na etiologia do líquen e na indução de alterações malignas nesta desordem (NEILL et al., 1990; TOKI et al., 1991; HØRDING et al., 1994; KAUFMAN, 1995; MILDE-LANGOSCH et al., 1995). Entretanto, HØRDING et al. (1991) e ANSINK et al. (1994) encontraram positividade em 50% e 36,8% dos casos, respectivamente. SAGERMAN et al. (1996) detectaram o vírus em 15,8% das pacientes com lesões distróficas associadas ao carcinoma invasivo, embora a presença ou ausência de hiperplasia escamosa não mostrasse diferença estatística. Os índices de detecção viral nas distrofias associadas ou desprovidas de neoplasia invasora foram distintos e significantes do ponto de vista estatístico. No trabalho de PINTO (1999), através da reação em cadeia da polimerase, o HPV foi detectado em 16,2% das hiperplasias escamosas e em 13,6% das lesões de líquen escleroso.

A presença do HPV nas lesões distróficas, embora seja geralmente pouco freqüente, indica que ambos não são mutuamente exclusivos e podem atuar conjuntamente como co-fatores na evolução de pelo menos alguns casos de neoplasia vulvar e que também não é possível dividir o carcinoma vulvar em duas entidades distintas, isto é, uma relacionada ao HPV e a outra não, tendo-se como base apenas a idade da paciente ou a presença de alterações distróficas (ANSINK et al., 1994; COSTA et al., 1995; HAEFNER et al., 1995; CARLSON et al., 1998).

BORGNO et al. (1988) observaram que o carcinoma invasivo vulvar contendo NIV III no epitélio adjacente, freqüentemente apresentava também alterações de HPV e hiperplasia escamosa associada, sugerindo que o vírus poderia estar envolvido na gênese da hiperplasia escamosa com atípias.

HAEFNER et al. (1995), estudando seis casos de NIV III associados ao líquen, detectaram o vírus em três deles; todos eram da variante bowenóide ou basalóide e um tinha carcinoma invasivo associado. Os três casos negativos eram NIV III da variante

diferenciada. Entretanto, eles notaram que o HPV não estava presente nas áreas de líquen, sugerindo que o vírus não está diretamente associado com o líquen e que as lesões de NIV e carcinoma invasivo se desenvolveram através de outros mecanismos não relacionados ao vírus, indicando a existência de duas formas de neoplasia associada ao líquen, uma associada ao HPV e outra não.

Embora a detecção viral fosse baixa no nosso trabalho, em apenas quatro casos, todas as pacientes tinham menos de 60 anos, três eram carcinoma invasivo basalóide e apresentavam alterações coilocitóticas associadas. Quatro tinham NIV III no epitélio adjacente e uma lesão distrófica representada por hiperplasia escamosa. Interrogamos se a hiperplasia não poderia ser apenas um fenômeno secundário à infecção viral e não uma entidade patológica distinta.

A ausência de um modelo histológico documentando a progressão das distrofias, e em particular do líquen, para o carcinoma invasor a partir de uma lesão precursora bem definida, leva-nos a questionar se estas lesões representam uma incriminação por associação, se são somente uma resposta do epitélio ao desenvolvimento da neoplasia invasora ou a um estímulo inflamatório inespecífico associado, ou se são alterações pré-malignas verdadeiras e até agora, nenhum estudo conseguiu provar que a distrofia é indubitavelmente um fator de risco importante (TRIBBIA et al., 1995; KAGIE et al., 1997a; CARLSON et al., 1998).

Muitas mulheres contêm lesões de líquen e poucas o carcinoma invasivo vulvar (NEILL et al., 1990; TRIBBIA et al., 1995; CARLSON et al., 1998). Seria isto secundário ao tratamento preventivo destas lesões, ou existiriam outros co-fatores como, por exemplo, as alterações genéticas, a susceptibilidade individual e a exposição a carcinógenos ambientais, que quando associados induziriam o desenvolvimento neoplásico? Além disso, uma proporção significativa de mulheres idosas contendo carcinoma vulvar não apresenta história de doença inflamatória crônica (ANDERSEN et al., 1991; CRUM, 1992).

A presença de padrões morfológicos distintos do carcinoma invasivo vulvar, de diferentes alterações no epitélio adjacente à neoplasia invasora, a variabilidade do índice de detecção do HPV e a heterogeneidade das características clínicas, sugerem que o carcinoma da vulva é uma doença multifatorial onde o HPV, as alterações distróficas e as doenças inflamatórias crônicas exercem um papel etiológico, atuando sinérgicamente ou de forma

isolada. Assim, parece que é uma doença de padrão bimodal, uma ocorrendo em mulheres mais jovens e possivelmente atribuída à infecção por HPV e outra, acometendo mulheres mais idosas e sem características epidemiológicas de doença sexualmente transmissível, cuja patogênese ainda não é conhecida, podendo ser idiopática, ou secundária a doenças inflamatórias crônicas ou distróficas da região vulvar (CRUM, 1992; HØRDING et al., 1993; RIDLEY, 1994; COSTA et al., 1995; FRANCO, 1996; SAGERMAN et al., 1996; PINTO, 1999).

A importância relativa destas diferentes condições na patogênese do carcinoma vulvar é ainda objeto de debate e as alterações epiteliais associadas ao carcinoma não são necessariamente os seus precursores críticos (BORGNO et al., 1988; SOINI et al., 1994; COSTA et al., 1995; HOMESLEY, 1995; EDWARDS et al., 1996; KAGIE et al., 1997a).

É de extrema importância descobrir se o câncer vulvar tem uma fase pré-clínica que poderia ser detectada precocemente permitindo um tratamento adequado e prevenindo assim o desenvolvimento de neoplasia invasora e conseqüentemente, diminuindo a sua incidência (GILES & KNEALE, 1995; TRIBBIA et al., 1995; EDWARDS et al., 1996). Entretanto, devido a estas incertezas, o tratamento das neoplasias intraepiteliais vulvares e das desordens epiteliais não neoplásicas ainda estão em discussão (KAGIE et al., 1997a).

No que se refere ao provável papel do HPV na origem do carcinoma vulvar, mesmo no grupo de mulheres jovens e naquelas pacientes com carcinoma cervical, algumas observações indicam que o vírus sozinho não é o suficiente para o desenvolvimento e progressão destes tumores, entre elas (CRUM & BURKETT, 1989; BRINTON et al., 1990; MILDE-LANGOSCH, BECKER, LÖNING, 1991; KIM et al., 1996):

- embora as neoplasias estejam geralmente associadas a tipos específicos do HPV, isto é, aos tipos 16/18, apenas uma pequena proporção das infecções com o HPV 16/18 se maligniza; além disso, foram identificados em alguns casos os tipos de baixo risco oncogênico;
- no carcinoma cervical, nem sempre o HPV encontra-se integrado ao DNA da célula hospedeira;
- em cerca de 10-20% das neoplasias escamosas cervicais intraepiteliais e invasoras não se detecta o vírus;

-as diferenças entre as características clínicas, epidemiológicas e da idade média das pacientes contendo NIV e daquelas com carcinoma invasor, sugerem que a sua evolução para neoplasia invasora envolve mais fatores do que o HPV sozinho.

Assim, a necessidade de eventos adicionais para o desenvolvimento e progressão dos tumores cervicais e vulvares é consistente com a visão de que a tumorigênese é um processo com múltiplos passos e com o envolvimento de outros cofatores como o fumo, fatores imunes, ambientais, hábitos, alterações genéticas, etc (CRUM & BURKETT, 1989; BRINTON et al., 1990; ANDERSEN et al., 1991; MILDE-LANGOSCH et al., 1991; KIM et al., 1996).

Certos aspectos no desenvolvimento do carcinoma vulvar sugerem que ocorrem alterações genéticas no epitélio escamoso precedendo o desenvolvimento do câncer, pois: as mulheres são geralmente idosas, não têm relação com a presença ou ausência do HPV, freqüentemente, porém não invariavelmente, segue-se às lesões distróficas e comumente são identificadas atipias celulares no epitélio adjacente (TATE et al., 1994, 1997). A maioria dos estudos até o momento teve como objetivo avaliar as conseqüências da infecção viral e o seu papel no desenvolvimento neoplásico na região vulvar e as pesquisas das alterações genéticas específicas que poderiam estar implicadas no desenvolvimento do carcinoma invasivo vulvar são muito limitados (EDWARDS et al., 1996).

Entretanto, o fato é que encontramos diferenças significantes entre os grupos de pacientes contendo lesões de NIV III ou distróficas associadas ao carcinoma invasor, quanto às idades médias, aos tipos histológicos e à presença de alterações coilocitóticas, em concordância com os trabalhos de HØRDING et al. (1994), MILDE-LANGOSCH et al. (1995), e CARLSON et al. (1998) e diferente dos achados de MITCHELL et al. (1993) e KAGIE et al. (1997c), os quais não observaram esta relação.

### **3. 7. 13. Gene supressor tumoral P53**

No carcinoma vulvar os estudos são escassos e parece que a freqüência da imunodeteção da proteína p53 e de mutação no gene P53 é maior do que no colo uterino, respectivamente 44% e 14% (TERVAHAUTA et al., 1993; LEE et al., 1994; HIETANEN et al., 1995b; KIM et al., 1996; KAGIE et al., 1997b). Além de escassos, os resultados são

variáveis, limitados e com pequeno número de casos avaliados. Isto é consistente com a teoria de que a inativação do gene P53 é um fenômeno crucial na carcinogênese do trato genital feminino inferior, seja através da formação de complexos com a oncoproteína viral E6, seja através de mutações genéticas, demonstrado pela presença do P53 em tumores contendo ou não o HPV (PILOTTI et al., 1993b, 1995; LEE et al., 1994; MONK et al., 1995; KAGIE et al., 1997b).

Assim, com a maior incidência de infecção por HPV no colo uterino e menor na região vulvar, é de se esperar que haja um maior índice de mutações no carcinoma da vulva, pelo menos no grupo de pacientes mais idosas, onde o HPV é raramente detectado. Isto poderia levar-nos a concluir que as mutações no gene P53 são mais importantes do que a infecção por HPV na carcinogênese vulvar na maioria das pacientes (TERVAHAUTA et al., 1993; LEE et al., 1994; HIETANEN et al., 1995a, 1995b; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; PILOTTI et al., 1995; KIM et al., 1996; McCONNELL et al., 1997).

TERVAHAUTA et al. (1993) observaram que a proteína p53 era mais freqüentemente identificada em pacientes mais idosas. Assim, na ausência do vírus, a aquisição de mutação do P53 pode ser secundária ao acúmulo de mutações somáticas tempo-dependentes, justificando o desenvolvimento do carcinoma mais tardiamente, visto que o carcinoma vulvar ocorre em faixa etária mais avançada e que a sua incidência aumenta em função direta com a idade; nas mulheres mais jovens, o gene pode ser inativado pela oncoproteína viral E6, permitindo que a neoplasia invasora se desenvolva uma ou duas décadas mais cedo (LEE et al., 1994; HIETANEN et al., 1995b; MONK et al., 1995). Além disso, também tem sido sugerido que a mutação espontânea do P53 pode se originar a partir de erros na síntese do DNA e do reparo associados a uma atividade celular proliferativa aumentada, secundária a fenômenos irritativos contínuos como a inflamação crônica e lesões distróficas, entre outras (HIETANEN et al., 1995b).

A relação entre detecção do vírus e do P53 no carcinoma invasivo vulvar também é controversa, sendo observados casos com e sem mutação, contendo ou não o HPV, com reação imuno-histoquímica para a proteína p53 positiva ou negativa (MILDE-LANGOSCH et al., 1995). Entretanto, nota-se que a maioria dos carcinomas vulvares não apresentam o vírus e que mais da metade contém gene mutado. Os casos onde não são detectados mutações e tampouco o vírus sugerem que devam existir outros mecanismos

patogenéticos envolvidos e que são independentes da inativação direta do gene P53 (PILOTTI et al., 1993b; LEE et al., 1994; KIM et al., 1996).

PINTO et al. (1999), identificou perdas alélicas em 32% dos carcinomas invasivos vulvares, independentemente da presença ou ausência do HPV e sugerem que os tumores HPV-negativos e positivos, à despeito das patogêneses distintas, apresentam similaridades no tipo e espectro das perdas alélicas durante a sua evolução. Ao contrário do colo uterino, a prevalência de perda alélica foi no cromossomo 17p (58,3%), sítio do gene supressor tumoral P53.

Embora alguns trabalhos não mostrem correlação entre a presença do vírus e a mutação do P53 (MILDE-LANGOSCH et al., 1995), parece haver uma tendência dos carcinomas HPV-negativos apresentarem uma maior incidência de mutações, quando comparados com àqueles onde o vírus está presente (PILOTTI et al., 1993b; TERVAHAUTA et al., 1993; KAGIE et al., 1997b).

HIETANEN et al. (1995a), avaliando nove linhagens de carcinoma vulvar invasor, encontraram mutação em oito e o vírus em apenas um caso, este desprovido de alteração no gene P53. HIETANEN et al. (1995b) identificaram mutações em cinco de oito linhagens estudadas; apenas uma continha o HPV, porém, desprovida de mutação.

PILOTTI et al. (1993b) e KIM et al. (1996) não detectaram o vírus em nenhum caso com mutação e LEE et al. (1994), em 20% dos casos. Além disso, estes últimos autores observaram que o vírus estava presente em 69% dos casos onde não havia expressão protéica do gene mutante.

No estudo de MILDE-LANGOSCH et al. (1995), a presença de mutações tinha distribuição semelhante nos grupos com neoplasia associada ou não ao HPV, respectivamente em 45,5% e 55,2% dos casos.

PILOTTI et al. (1995) detectaram o HPV em 29,4% dos casos de carcinoma invasivo vulvar, sendo que neste grupo onde o vírus estava presente, 40% também tinham proteína p53 mutante.

Quanto ao exame imuno-histoquímico para a detecção da proteína p53, observa-se em diferentes estudos a sua presença concomitantemente à detecção do vírus em

33 a 83% dos casos (TERVAHAUTA et al., 1993; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; PILOTTI et al., 1995; KAGIE et al., 1997b). MILDE-LANGOSCH et al. (1995) e KAGIE et al. (1997b) encontraram aumento na detecção da p53, com distribuição semelhante nos casos contendo ou não o HPV. Entretanto, KAGIE et al. (1997b) ressaltam que se fossem considerados somente os casos com reação fortemente positiva, a distribuição era diferente do ponto de vista estatístico, presente em 41% dos casos desprovidos do vírus e em somente 12% daqueles onde o HPV estava presente.

Inversamente, cerca de 23 a 35% dos casos não contém o vírus e tampouco a proteína p53 (PILOTTI et al., 1995; KAGIE et al., 1997b).

No carcinoma invasivo vulvar, mutação do P53 ocorre em uma frequência de 22 a 62,5% dos casos, com média ao redor de 40% e a imunodeteção entre 50 e 88%, com média de 65% (PILOTTI et al., 1993b, 1995; TERVAHAUTA et al., 1993; LEE et al., 1994; HIETANEN et al., 1995b; KOHLBERGER et al., 1995; MILDE-LANGOSCH et al., 1995; KIM et al., 1996; KAGIE et al., 1997a, 1997b; McCONNELL et al., 1997; SLIUTZ et al., 1997; CARLSON et al., 1998).

Poucos são os trabalhos que correlacionam a presença de mutação com a expressão protéica, a maioria não conseguindo associá-las. MILDE-LANGOSCH et al. (1995) observaram que 62% dos casos contendo mutação e 36,8% sem, tinham proteína aumentada, sendo que em 57% daqueles sem mutação, a intensidade da coloração foi fraca.

PILOTTI et al. (1993b) notaram que 75% dos casos com mutação e 100% daqueles sem, tinham a proteína p53.

PILOTTI et al. (1995) detectaram a p53 em 83% dos casos com e em 90% sem mutação, sendo que neste último grupo, em 56% a coloração era de forte intensidade.

HIETANEN et al. (1995b), analisando quatro linhagens celulares do carcinoma vulvar com níveis aumentados da proteína p53, identificaram mutações em três delas (75%).

Assim como na neoplasia invasora, existem menos informações ainda sobre o estado do gene P53 nas lesões pré-cancerosas, distróficas e mesmo no epitélio normal da vulva adjacente à neoplasia invasora.

O epitélio normal adjacente ao carcinoma raramente é positivo para a proteína p53 (SOINI et al., 1994; KIM et al., 1996; McCONNELL et al., 1997). KAGIE et al. (1997a) encontraram reação positiva em 13% dos casos estudados e também, em 18% das neoplasias intraepiteliais vulvares grau I e em 18% no grau II.

No trabalho de KOHLBERGER et al. (1998), todos os casos de NIV III adjacentes à neoplasia invasora foram negativos. KAGIE et al. (1997a) encontraram positividade em 13% e MILDE-LANGOSCH et al. (1995) e McCONNELL et al. (1997) em cerca de 35% dos casos.

Em relação às lesões distróficas, a sua detecção é muito variada, entre 0-14% nas áreas de hiperplasia escamosa (KIM et al., 1996; KAGIE et al., 1997a), 27-76% no líquen escleroso (MILDE-LANGOSCH et al., 1995; KAGIE et al., 1997a; CARLSON et al., 1998) e em 27% das lesões distróficas em geral (McCONNELL et al., 1997).

MILDE-LANGOSCH et al. (1995) encontraram mutações em 70% dos carcinomas associados ao líquen escleroso, embora a detecção da proteína tenha ocorrido em somente 40% deles.

CARLSON et al. (1998) identificaram a p53 em 76% dos carcinomas contendo líquen adjacente e em 85% das lesões desprovidas do mesmo; entretanto, foi significativa a presença de maior número de casos com reação fortemente positiva dentro do grupo com líquen escleroso.

McCONNELL et al. (1997) não notaram diferenças significativas na distribuição da proteína p53 entre os diferentes tipos de lesões distróficas.

TAN et al. (1994) em um estudo comparativo entre lesões de líquen escleroso na região vulvar e em localizações extra-genitais, observaram maior detecção da proteína p53 na vulva e as áreas de líquen eram mais fortemente positivas do que o epitélio vulvar normal. Estes autores referem que fora do trato genital, o líquen não tem potencial maligno e questionam se estas diferenças exercem um papel na patogênese do carcinoma vulvar.

SOINI et al. (1994) realizaram estudo imuno-histoquímico para a detecção da proteína p53 e do marcador de proliferação celular PCNA em lesões de líquen e identificaram reação positiva para ambos nas camadas basal e parabasal do epitélio em 73%

e 91% dos casos respectivamente e notaram que aqueles com coloração mais intensa para a proteína p53 estavam diretamente relacionados à maior expressão do PCNA e ao número de mitoses. Para os autores, estas observações confirmam a hipótese de que a positividade da reação é resultante do acúmulo da proteína p53 não mutante, refletindo talvez um alto índice de apoptose.

CARLSON et al. (1998) encontraram maior positividade para a p53 em lesões de líquen quando comparados com grupos-controle contendo líquen simples crônico ou epitélio normal, nas pacientes com carcinoma invasivo associado ao líquen em comparação com aquelas desprovidas de distrofia e também nas lesões aneuplóides. Os autores afirmam que esta marcada positividade nos casos de líquen indica pelo menos um alto nível de reparo do DNA celular com acúmulo de proteína não funcionante, sendo responsável pela indução da maioria das instabilidades genéticas, atestando assim, a importância do gene P53 e o seu envolvimento precoce na carcinogênese vulvar. Entretanto, ainda não se sabe ao certo a origem destas mutações nas lesões de líquen, se secundárias à ação de carcinógenos exógenos ou de processos biológicos endógenos.

KAGIE et al. (1997a) consideram que a detecção da proteína p53 na seqüência variando desde o epitélio adjacente normal até a neoplasia invasora é freqüente e que a sua presença em lesões distróficas pode indicar características de alterações pré-malignas ou, apenas uma resposta de reparação ao dano do DNA. KIM et al. (1996) referem que a ausência de mutação nas lesões de hiperplasia escamosa adjacente ao carcinoma indica que esta entidade não é um precursor direto dos tumores HPV negativos na maioria dos casos ou, que a mutação ocorre tardiamente na progressão da neoplasia.

Em neoplasias associadas à NIV III e à distrofia concomitantemente, a imunodeteção da p53 estava presente entre 32 a 63% dos casos nos trabalhos de KAGIE et al. (1997a) e McCONNELL et al. (1997), respectivamente. KAGIE et al. (1997a) referem que em um caso a reação positiva ocorreu em ambos os epitélios alterados, em cinco somente na lesão de NIV e em três, apenas no epitélio distrófico.

McCONNELL et al. (1997) não encontraram correlação entre o tipo de alteração do epitélio adjacente e a detecção da proteína p53, embora tenham notado que o grupo que mais corou foi aquele contendo lesão de NIV III associado à lesão distrófica. Além disso, a reação positiva presente em toda a espessura do epitélio foi mais freqüente

nas pacientes com NIV, sozinha ou associada à distrofia, quando comparadas com aquelas contendo apenas alterações distróficas.

A observação de que as lesões pré-cancerosas cervicais e vulvares apresentam uma frequência menor de positividade da proteína p53 do que os carcinomas invasivos, levam à interpretações contraditórias onde alguns autores consideram que isto significa que a mutação é um evento inicial na carcinogênese (AKASOFU & ODA, 1995; MILDE-LANGOSCH et al., 1995), enquanto que para outros, este seria um evento tardio e não precede à invasão (TERVAHAUTA et al., 1993; WALTERS et al., 1993; PILOTTI et al., 1995; ter HARMSEL et al., 1995; KIM et al., 1996).

Em concordância com os trabalhos da literatura, detectamos a proteína p53 em 58,2% dos casos, 81,3% de moderada ou forte intensidade. Estava diretamente associada apenas à profundidade de invasão estromal maior do que três milímetros e à presença de alterações coilocitóticas. Não observamos correlação com a idade média das pacientes, com o tipo histológico e o grau de diferenciação da neoplasia, com a detecção do vírus, com a presença de metástases ganglionares ou com lesões recidivantes.

McCONNELL et al. (1997) não encontraram relação com a profundidade de invasão. Os trabalhos de MILDE-LANGOSCH et al. (1995) e KAGIE et al. (1997a, 1997b) não conseguiram demonstrar relação com as variantes histológicas.

TERVAHAUTA et al. (1993) e MILDE-LANGOSCH et al. (1995) identificaram maior positividade no grau histológico I e McCONNELL et al. (1997) nos grupos com grau I e II, enquanto WALKER et al. (1989), TERVAHAUTA et al. (1993) e SLIUTZ et al. (1997), não encontraram relação com o grau histológico.

A detecção da proteína p53 estava associada à presença de metástases ganglionares no estudo de McCONNELL et al. (1997), ao contrário dos achados de PILOTTI et al. (1995).

Embora alguns autores considerem este método como marcador prognóstico, WALKER et al. (1989) e MILDE-LANGOSCH et al. (1995) não conseguiram correlacionar a positividade da proteína p53 com o estágio clínico da doença.

A distribuição das alterações epiteliais adjacentes foi semelhante nos grupos positivos e negativos. Encontramos reação positiva no epitélio adjacente à neoplasia invasora em oito casos (25%), contendo hiperplasia escamosa, NIV I, II, III e doença de Paget. Em um caso com hiperplasia e em outro com NIV II bowenóide, a positividade estava localizada apenas no epitélio alterado; no restante, também havia reação positiva no tumor invasivo.

### 3. 8. OUTRAS VARIANTES HISTOLÓGICAS RARAS DO CARCINOMA INVASIVO DA VULVA

Antes de finalizar o tópico do carcinoma invasivo, queremos apontar para a presença de uma paciente de 88 anos contendo doença de Paget multifocal associada ao tipo histológico usual pouco diferenciado com queratinização focal, sem sinais de infecção viral e com detecção da proteína p53 nas áreas de invasão e nas células de Paget.

A doença de Paget vulvar é incomum e está presente principalmente em mulheres idosas, com idade média de 65 anos, embora a vulva seja o sítio extra-mamário mais freqüente, correspondendo a 1-5% das neoplasias vulvares (HOMESLEY, 1995; KODAMA et al., 1995).

Mesmo com a utilização de recursos imuno-histoquímicos e ultraestruturais, a sua histogênese é ainda incerta e com opiniões divergentes. Alguns autores acreditam que as células de Paget se originam da transformação de células germinativas pluripotentes intraepidérmicas ou da porção poral dos ductos sudoríparos; outros acham que é secundária à migração de células neoplásicas para a epiderme originárias de neoplasia subjacente ou interna regional (GUARNER, COHEN, DeROSE, 1989; EDWARDS et al., 1996).

Apenas 20 a 30% das pacientes apresentam história de outras neoplasias, predominantemente na mama e trato genito-urinário (HOMESLEY, 1995; KODAMA et al., 1995; EDWARDS et al., 1996).

KODAMA et al. (1995) e EDWARDS et al. (1996) encontraram maior freqüência de neoplasias primárias das glândulas sudoríparas e de Bartholin. No nosso caso, a neoplasia subjacente era do tipo escamoso e embora pouco diferenciado, havia queratinização focal, indicando origem escamosa.

São raros os relatos na literatura associando doença de Paget com o carcinoma epidermóide. LeBOIT, CRUTCHER, SHAPIRO (1992) referem que entre as neoplasias que podem mais raramente causar disseminação pagetóide estão: carcinoma de Merckel onde o autor relata seis casos, Doença de Bowen, melanoma maligno, linfoma cutâneo de células T, carcinoma sebáceo, histiocitose X e carcinoma.

Dentre os 30 casos estudados por KODAMA et al. (1995), nove apresentava carcinoma indiferenciado subjacente. ISHIZAWA et al. (1998) relatam um caso associado ao carcinoma basocelular.

KODAMA et al. (1985) encontraram coexistência de Paget vulvar com quatro carcinomas indiferenciados e um carcinoma epidermóide. Neste último, as lesões estavam localizadas em áreas distintas, diferente do nosso caso.

Assim como nós, BORNSTEIN et al. (1988b) e SNOW et al. (1992) não detectaram o HPV nas células de Paget através da hibridização molecular *in situ*.

Quando a doença de Paget apresenta-se apenas como lesão intraepitelial o prognóstico é bom, embora exista alta freqüência de recidivas e é pobre, com metástases precoces naquelas associadas à neoplasia invasora subjacente (KODAMA et al., 1995).

Outra peculiaridade que gostaríamos de relatar é a presença de dois casos diagnosticados como carcinoma verrucoso. As pacientes tinham 78 e 80 anos de idade, respectivamente e nenhuma apresentava alterações coilocitóticas ou exame positivo para o HPV e p53. Uma estava associada ao líquen escleroso e a outra não tinha alterações no epitélio adjacente à neoplasia invasora.

Esta entidade é considerada como uma variante bem diferenciada do carcinoma escamoso, com baixo grau de malignidade, curso clínico indolente, localmente destrutiva, com recorrências freqüentes e metástases raras (PILOTTI et al., 1984; ANDERSEN & SORENSEN, 1988; BRISIGOTTI et al., 1989; ACOG, 1994). É uma doença pouco freqüente e acomete mulheres pós-menopausadas, com pico entre a sexta e sétima década (PILOTTI et al., 1984; ANDERSEN & SORENSEN, 1988; BRISIGOTTI et al., 1989; ACOG, 1994).

Entretanto, a sua real incidência é difícil de ser estimada devido a erros diagnósticos e à sua classificação com outros nomes como condiloma acuminado, condiloma acuminado gigante, hiperplasia escamosa, carcinoma escamoso bem diferenciado e carcinoma escamoso condilomatoso (PILOTTI et al., 1984; ACOG, 1994).

É caracterizado microscopicamente por hiperqueratose, acantose, papilomatose e crescimento endofítico, com formação de massas tumorais com bordos arredondados e de aspecto compressivo na interface com o estroma. As atipias nucleares são mínimas e pode conter alterações coilocitóticas (ANDERSEN & SORENSEN, 1988; BRISIGOTTI et al., 1989). Pode também coexistir com o líquen escleroso, presente em quatro dos cinco casos estudados por BRISIGOTTI et al. (1989) e mais raramente, apresentar neoplasia intraepitelial adjacente (PILOTTI et al., 1984, 1993a; ANDERSEN & SORENSEN, 1988).

Encontramos apenas dois trabalhos de carcinoma verrucoso vulvar com pesquisa do gene P53. TERVAHAUTA et al. (1993) detectaram a proteína p53 no único caso estudado, ao contrário do nosso trabalho e de PILOTTI et al. (1993a), o qual não identificou alterações da proteína bem como do gene P53 através do seqüenciamento do DNA e compatível com o curso indolente desta lesão.

A sua etiologia é ainda controvertida. Embora o HPV tenha sido detectado em carcinoma verrucoso da cavidade oral, região anogenital e pele em geral (BUSCEMA et al., 1988; TERVAHAUTA et al., 1993), outros não conseguiram identificá-lo (PILOTTI et al., 1984, 1993a; ANDERSEN & SORENSEN, 1988). Apesar de serem relatados fatores de risco como o álcool, fumo e o baixo nível de higiene local (ANDERSEN & SORENSEN, 1988), eles estão presentes em apenas uma minoria dos casos. Assim, é necessário que sejam realizados mais estudos devido à sua raridade e dificuldade diagnóstica.

#### 4. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TRÊS GRUPOS DE PACIENTES

Na tentativa de identificarmos a existência de um grupo de pacientes com fatores de risco semelhantes aos daquelas com NIV III e com o intuito de estudar o grupo contendo carcinoma escamoso superficialmente invasivo por serem extremamente raras e verificarmos a qual dos grupos se aproximava mais, se das pacientes contendo NIV III ou carcinoma invasivo, realizamos a comparação das características encontradas nos três grupos.

Como pudemos observar na tabela 19, houve diferença significativa entre os três grupos de pacientes quanto à idade média, à presença de lesões multicêntricas, de alterações coilocitóticas e de condiloma, com a detecção do HPV e da proteína p53. Entretanto, esta diferença foi secundária à heterogeneidade acentuada entre as pacientes do grupo com NIV III e com carcinoma escamoso invasivo e talvez também devido ao pequeno número de casos de carcinoma superficialmente invasivo.

Nos três grupos de pacientes, a idade média foi semelhante entre aquelas contendo lesões multicêntricas, condiloma, alterações coilocitóticas, NIV III bowenóide, a presença do HPV e da proteína p53.

São escassos os trabalhos na literatura sobre o carcinoma superficialmente invasivo, muito provavelmente pela sua raridade, tornando-se difícil a sua interpretação adequada devido à utilização de diferentes parâmetros para a gradação da profundidade de invasão estromal.

WILKINSON (1991) relata que lesões com até um milímetro de invasão apresentam NIV III adjacente em até 60 a 83% dos casos e que 50% contém alterações coilocitóticas. Nós observamos estas características em 88,9% e 100% dos casos, respectivamente.

Quanto à idade média das pacientes, esta foi de 57,9 anos, enquanto que PILOTTI et al. (1989), HØRDING et al. (1991) e van der VELDEN et al. (1996), encontraram respectivamente idade média de 49,2, 52,5 e 45 anos, sendo que o critério limite da profundidade de invasão foi de três ou cinco milímetros.

Como nos trabalhos de HØRDING et al. (1991), NUOVO et al. (1991b) e TRIMBLE et al. (1996), encontramos diferenças significantes entre as idades médias das pacientes com lesões de NIV III e carcinoma invasor. Entretanto, não havia diferença entre as contendo NIV III bowenóide sozinho e aquelas com NIV III bowenóide associado ao carcinoma invasivo, diferente dos resultados obtidos por HAEFNER et al. (1995).

Embora tenhamos observado que a idade média e o índice de detecção viral no carcinoma invasivo basalóide se aproxima ao dos casos de NIV III, não observamos como relatado na literatura, esta associação com a variante condilomatosa (TRIMBLE et al., 1996; PILOTTI et al., 1995). Porém, devemos ressaltar que apenas quatro era de padrão condilomatoso, podendo ser este o fator responsável pela ausência de significância estatística ou, que as alterações interpretadas como alterações coilocitóticas associadas à lesão exofítica, são na realidade apenas alterações degenerativas induzindo a erros de interpretação e equivocadamente diagnosticadas como carcinoma condilomatoso.

O carcinoma superficialmente invasivo aparentemente apresentou características intermediárias entre os outros grupos em relação à idade média, à presença de condiloma e à detecção do vírus. Encontramos maior incidência de lesões multicêntricas e de alterações coilocitóticas em relação aos outros dois grupos e a detecção da proteína foi semelhante àquelas contendo carcinoma invasor.

A idade das pacientes com carcinoma superficialmente invasivo foi semelhante à daquelas com NIV III, como nos trabalhos de PILOTTI et al. (1984, 1995) e de HØRDING et al. (1995) e diferente dos de PILOTTI et al. (1989) e HØRDING et al. (1991) e significativamente distinta daquelas com carcinoma invasor, em concordância com os resultados de PILOTTI et al. (1989) e HØRDING et al. (1991).

O mesmo foi observado em relação à presença de alterações coilocitóticas e do HPV, semelhante aos achados de PILOTTI et al. (1984, 1995).

Ao contrário de PILOTTI et al. (1995), os índices de detecção do p53 foram diferentes entre os grupos com NIV III e carcinoma superficialmente invasivo e semelhantes entre aqueles com carcinoma invasivo e superficialmente invasivo.

## 5. TABELAS-RESUMO DOS PRINCIPAIS ACHADOS NOS TRÊS GRUPOS DE PACIENTES

**TABELA 34**  
Pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar grau III

| Variáveis analisadas                | Resultados encontrados                       | Significância estatística da comparação desta variável com as outras analisadas |
|-------------------------------------|--|---|
| <b>Idade:</b>                       |  |   |
| - <i>variou entre</i>               | 15 a 82 anos                                 |   |
| - <i>idade média</i>                | 47,5 anos                                    | NS  |
| - <i>abaixo de 40 anos</i>          | 45,9%  |   |
| Doenças do TGF associadas           | 36,8%  | NS  |
| Presença de lesões multifocais      | 72,2%  | NS  |
| Variantes histológicas da neoplasia | 92,1% bowenóide<br>7,9% basalóide            | NS  |
| Alterações coilocitóticas           | 76,3%  | NS  |
| Alterações no epitélio adjacente    | 45,7% condiloma<br>5,7% hiperplasia escamosa | NS  |
| Deteção do HPV por IHQ ou HIS       | 57,9%  | idade média (p=0,02)  |
| Deteção da proteína p53             | 21,1%  | NS  |

TGF: trato genital feminino inferior

NS: ausência de significância estatística

HPV: papilomavírus humanos IHQ: imuno-histoquímica HIS: hibridização molecular *in situ*

**TABELA 35**  
Pacientes com carcinoma superficialmente invasivo

| Variáveis analisadas             | Resultados encontrados                     | Significância estatística da comparação desta variável com as outras analisadas |
|----------------------------------|--|---|
| <b>Idade:</b>                    |  |   |
| - <i>variou entre</i>            | 37 a 88 anos                               |   |
| - <i>idade média</i>             | 57,9 anos                                  | NS  |
| - <i>abaixo de 40 anos</i>       | 22,2%                                      |   |
| Doenças do TGF associadas        | 55,6%                                      | NS  |
| Presença de lesões multifocais   | 55,6%                                      | idade média (p=0,05)  |
| Alterações coilocitóticas        | 100%                                       | multifocalidade (p=0,05)  |
| Alterações no epitélio adjacente | 88,9% NIV III bowenóide<br>22,2% condiloma | NS  |
| Deteção do HPV por IHQ ou HIS    | 33,3%                                      | NS  |
| Deteção da proteína p53          | 66,7%                                      | NS  |

TGF: trato genital feminino inferior

NS: ausência de significância estatística

NIV III: neoplasia intraepitelial vulvar grau III

HPV: papilomavírus humanos IHQ: imuno-histoquímica HIS: hibridização molecular *in situ*

\* deve ser lembrado que o pequeno número de casos neste grupo impossibilitou a análise estatística adequada

TABELA 36

## Pacientes com carcinoma escamoso invasivo

| Variáveis analisadas   | Resultados encontrados   | Significância estatística da comparação desta variável com as outras analisadas  |
|--|--|--|
| Idade:<br>- variou entre<br>- idade média<br>- abaixo de 40 anos | 34 a 89 anos<br>67,8 anos<br>3,6%                                      | NS   |
| Doenças do trato genital inferior associadas                     | 7,3%   | - idade média (p=0,02)<br>- focalidade (p=0,04)<br>- presença do HPV (p=0,001)   |
| Presença de lesões multifocais                                   | 23,6%  | - doença do TGF (p=0,04)   |
| Variantes histológicas da neoplasia                              | 78,2% usual<br>10,9% basalóide<br>7,3% condilomatoso<br>3,6% verrucoso | - basalóide x usual: . idade média (p=0,02)<br>. alteração do epitélio adjacente (p=0,01)<br>. grau de alterações coilocitóticas (p=0,003)<br>. presença HPV (p=0,02)<br>- cond/bas x usual/verr: alterações coilocitóticas (p=0,0005)<br>- bas. x cond.: alteração do epitélio adjacente (p=0,05) |
| Alterações coilocitóticas  | 54,5%  | - idade média (p=0,05)<br>- variante bas. x usual (p=0,003)<br>- intensidade da coilocitose: . detecção do HPV (p=0,02)<br>. epitélio adjacente (p<0,0001)   |
| Alterações no epitélio adjacente                                 | 60% distrofia<br>25,5% NIV III   | - idade média: . NIV III x distrofia (p=0,07)<br>. presença de condiloma (p=0,0007)<br>- tipo histológico (p=0,01)<br>- alterações coilocitóticas (p=0,03)<br>- presença do HPV (p=0,04)   |
| Metástases ganglionares  | 56,8%  | - profundidade de invasão: 3mm (p=0,05) e 5mm (p=0,08)<br>- lesões maiores do que 3cm (p=0,006)<br>- envolvimento do clitóris (p=0,005)<br>- grau de diferenciação do tumor (p=0,05)   |
| Deteção do HPV por IHQ ou HIS                                    | 7,3%   | - análise multivariada: . idade média (p=0,05)<br>. doença do TGF (p=0,04)<br>- análise univariada: . idade média (p=0,008)<br>. doença do TGF (p=0,001)<br>. variante basalóide (p=0,02)<br>. intensidade da coilocitose (p=0,02)   |
| Deteção da proteína p53  | 58,2%  | - profundidade de invasão > 3mm (p=0,04)<br>- presença de coilocitose (p=0,01)   |

NS: ausência de significância estatística

TGF: trato genital feminino inferior

cond: condilomatoso bas: basalóide

verr: verrucoso

HPV: papilomavírus humanos

IHQ: imuno-histoquímica

HIS: hibridização molecular *in situ*

## VI. CONCLUSÕES

---

Ao final deste trabalho, podemos observar que:

### **1. *No grupo de pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar grau III:***

- as mulheres eram mais jovens e apresentavam freqüentemente lesões multicêntricas, detecção do papilomavírus humano e baixa positividade para a proteína p53;
- a presença de papilomavírus humano estava associada a pacientes mais jovens, contendo lesões com sinais histológicos atribuíveis ao HPV e não relacionada à detecção da proteína p53.

### **2. *No grupo de pacientes com carcinoma escamoso invasivo vulvar:***

- as mulheres eram mais idosas, apresentavam mais comumente a variante histológica queratinizante usual, lesões distróficas associadas, imunodeteção da proteína p53 e baixos índices de detecção de papilomavírus humano;
- dentro deste grupo existe uma pequena subpopulação de pacientes que são mais jovens, freqüentemente associada à variante histológica basalóide do carcinoma invasor, à lesão de NIV III e à detecção do papilomavírus humano;
- a presença do HPV estava associada à pacientes mais jovens, à presença de lesões multicêntricas e à variante histológica basalóide do carcinoma invasor, embora através da análise estatística multivariada, apenas os dois primeiros tenham continuado significantes, onde as pacientes mais jovens e com lesões multicêntricas associadas possuem uma maior probabilidade de apresentar infecção por HPV;

- ao contrário dos trabalhos relatados na literatura, a variante condilomatosa apresentou características semelhantes ao padrão queratinizante usual. Estes achados podem ser interpretados como secundários à presença de poucos casos disponíveis para avaliação no presente estudo, ou à classificação equivocada de neoplasias queratinizantes usuais bem diferenciadas dentro da categoria condilomatosa;
- a imunodeteção da proteína p53 não estava associada com a idade das pacientes, com a variante histológica, com a detecção do HPV, com lesões recidivantes ou com a presença de metástases ganglionares; entretanto, mostrou correlação com a profundidade de invasão tumoral. Assim, nos parece que a proteína p53 não serve como marcador para lesões recidivantes ou metastáticas, pelo menos no nosso grupo de estudo;
- a associação da variante usual com a presença de lesões distróficas e imunodeteção da proteína p53 em mulheres mais idosas e do padrão basalóide com pacientes de grupo etário mais jovem e freqüentemente contendo reação positiva para o HPV, está de acordo com os relatos da literatura, sugerindo o envolvimento de uma etiopatogenia multifatorial na carcinogênese vulvar. Assim, parece que para os diferentes tipos histológicos do carcinoma invasor existe uma etiologia distinta, de provável origem viral (por HPV) no último grupo e no primeiro, de etiologia indefinida até o presente momento, onde as lesões distróficas e o P53 exercem um papel ainda obscuro no desenvolvimento do câncer vulvar. Esta hipótese também é apoiada pela observação de que pacientes com carcinoma invasivo associado à lesões multicêntricas, ao NIV III e à detecção do HPV, apresentam idade média mais jovem, semelhante à idade das pacientes contendo apenas lesão de NIV III.

### ***3. No grupo de pacientes com carcinoma escamoso superficialmente invasivo:***

- 89% apresentavam NIV III bowenóide no epitélio adjacente, indicando a possibilidade de progressão da lesão intraepitelial para neoplasia invasiva;
- embora a amostra fosse pequena, as suas características clínico-patológicas se assemelhavam mais ao grupo de pacientes com lesões de NIV III, exceto a detecção da proteína p53, cujo índice estava mais próximo ao do grupo com carcinoma escamoso invasivo. Esta é uma lesão pouco freqüente, gerando uma grande curiosidade quanto à sua origem e história natural e esperamos conseguir coletar novos casos que possam se somar a estes, com a finalidade de se realizar posteriormente um outro estudo com este grupo de pacientes.

### ***4. Na avaliação dos três grupos de pacientes em conjunto:***

- o HPV 16/18 (de alto risco oncogênico) foi o tipo predominante em todos os grupos, presente em 95% dos casos onde o DNA viral foi detectado, sozinho (15 casos) ou associado a outros tipos (cinco casos). Infecção mista foi mais freqüente no grupo contendo apenas NIV III (4/5 casos);
- a análise estatística univariada dos três grupos em conjunto mostrou uma relação inversa entre a detecção do p53 e a presença do papilomavírus humano. Entretanto, este parâmetro perdeu a sua significância quando da análise multivariada;
- menores índices de imunodeteção da proteína p53 nas lesões de NIV III e maior e com distribuição semelhante nos grupos com carcinoma superficialmente invasivo e carcinoma escamoso invasivo, sugerem que a p53 está relacionada à presença de invasão estromal pela neoplasia e não com a presença do papilomavírus humano.

## SUMMARY

---

Vulvar squamous cell carcinoma still is a disease of unknown etiology. Recent studies have pointed out to a multifactorial origin, with HPV as the causal agent in the development of vulvar neoplasia in younger age groups, whereas in older patients it would be possibly related to dystrophic lesions, genetic mutations, and other factors still unknown. Our purpose was to analyze the presence of HPV and p53 overexpression and correlate them with other clinical and pathological parameters in patients with vulvar intraepithelial neoplasia grade III (VIN III – 38 cases), superficially invasive carcinoma (nine cases), and invasive squamous cell carcinoma of the vulva (55 cases). HPV infection was determined by immunoperoxidase reaction with a policlonal antibody against HPV and by *in situ* hybridization with biotinilated probes for wide spectrum and HPV types 6/11, 16/18 and 31/35/51. P53 overexpression was detected by immunoperoxidase reaction with the monoclonal antibody DO-7. In the VIN III group, the mean age was 47.5 years; 45.7% had associated condylomatous lesions, HPV infection was detected in 57.9% of the cases, and p53 overexpression in 21.1%. The patients with superficially invasive carcinoma had mean age of 57.9 years, condylomatous lesions in 22.2%, HPV infection in 33.3%, and p53 overexpression in 66.7% of the cases. In the invasive squamous carcinoma group the mean age was 67.8 years; 7.3% of the patients had associated condylomatous lesions, 60% presented with dystrophic lesions and 25.5% with VIN III; HPV were identified in 7.3%, and p53 overexpression in 58.2% of the cases. Our findings revealed that HPV detection occurred mainly in the VIN III group and was related to younger patients. In the invasive squamous carcinoma group, the most common histological variant was the usual type of keratinizing squamous cell carcinoma, and it was associated to dystrophic lesions and p53 overexpression. However, a small subpopulation of younger patients contained the basaloid type of invasive carcinoma, and it was frequently associated to VIN III lesions and HPV infection. Our results are similar to other reports, where two separate entities of the disease exist, one associated with HPV infection, and other unrelated to it. HPV 16/18 was the predominant type in all the three groups of lesions. The weakness or absence of p53 overexpression in VIN III lesions, and its higher detection, with stronger positivity and similar distribution in superficially invasive and invasive carcinoma, together with the lack of relationship between p53 overexpression and HPV infection, indicates that p53 overexpression is related to neoplastic stromal invasion and it is independent of HPV infection. P53 detection was associated only to the depth of stromal invasion and unrelated to tumor recurrence or lymph node metastasis and therefore, it had no significance as a prognostic marker, at least in the group of patients included in this study.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- ACOG technical bulletin: vulvar cancer. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **44**: 79-85, 1994.
- ACOG educational bulletin: vulvar nonneoplastic epithelial disorders. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **60**: 181-8, 1998.
- AKASOFU, M. & ODA, Y. – Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Virchows Arch.*, **425**: 593-602, 1995.
- ANDERSEN, W.A.; FRANQUEMONT, D.W.; WILLIAMS, J.; TAYLOR, P.T.; CRUM, C.P. – Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: two separate entities? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**: 329-36, 1991.
- ANDERSEN, E.S. & SORENSEN, I.M. – Verrucous carcinoma of the female genital tract: report of a case and review of the literature. *Gynecol. Oncol.*, **30**: 427-34, 1988.
- ANSINK, A.C.; KRUL, M.R.L.; De WEGER, R.A.; KLEYNE, J.A.F.W.; PIJPERS, H.; van TINTEREN, H.; De KRAKER, E.W.; HELMERHORST, T.J.M.; HEINTZ, A.P.M. – Human papillomavirus, lichen sclerosus, and squamous cell carcinoma of the vulva: detection and prognostic significance. *Gynecol. Oncol.*, **52**: 180-4, 1994.
- BARBERO, M.; MICHELETTI, L.; PRETI, M.; CAVANNA, L.; BOSELLI, F.; GARUTI, G.; VALENTINO, M.C.Z.; NICOLACI, P.; GHIRINGHELLO, B.; BORGNO, G. – Vulvar intraepithelial neoplasia: a clinicopathologic study of 60 cases. *J. Reprod. Med.*, **35**: 1023-8, 1990.
- BARBERO, M.; MICHELETTI, L.; PRETI, M.; VALENTINO, M.C.Z.; NICOLACI, P.; CANNÍ, M.; GHIRINGHELLO, B.; BORGNO, G. – Biologic behavior of vulvar intraepithelial neoplasia: histological and clinical parameters. *J. Reprod. Med.*, **38**: 108-12, 1993.
- BARNES, W.; DELGADO, G.; KURMAN, R.J.; PETRILLI, E.S.; SMITH, D.M.; AHMED, S.; LORINCZ, A.T.; TEMPLE, G.F.; JENSON, A.B.; LANCASTER, W.D. – Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, **29**: 267-73, 1988.

- BECKMANN, A.M.; ACKER, R.; CHRISTIANSEN, A.E.; SHERMAN, K.J. – Human papillomavirus infection in women with multicentric squamous cell neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **165**: 1431-7, 1991.
- BEIGUELMAN, B. – **Curso prático de bioestatística**. 2.ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 224p.
- BENEDET, J.L.; BENDER, H.; JONES, H.<sup>3rd</sup>; NGAN, H.Y.; PECORELLI, S. – FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, **70**: 209-62, 2000.
- BERCHUCK, A.; KOHLER, M.F.; MARKS, J.R.; WISEMAN, R.; BOYD, J.; BAST, R.C., Jr. – The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **170**: 246-52, 1994.
- BORGNO, G.; MICHELETTI, L.; BARBERO, M.; PRETI, M.; CAVANNA, L.; GHIRINGHELLO, B. – Epithelial alterations adjacent to 111 vulvar carcinomas. **J. Reprod. Med.**, **33**: 500-2, 1988.
- BORNSTEIN, J.; KAUFMAN, R.H.; ADAM, E.; ADLER-STORTHZ, K. – Multicentric intraepithelial neoplasia involving the vulva: clinical features and association with human papillomavirus and herpes simplex virus. **Cancer**, **62**: 1601-4, 1988a.
- BORNSTEIN, J.; KAUFMAN, R.H.; ADAM, E.; BUREK, J.; ADLER-STORTHZ, K. – Paget's disease of the vulva: search for herpes simplex virus antigens and human papillomavirus antigen and DNA. **Gynecol. Oncol.**, **31**: 384-8, 1988b.
- BORNSTEIN, J.; RAHAT, M.A.; ABRAMOVICI, H. – Etiology of cervical cancer: current concepts. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **50**: 146-52, 1995.
- BOSARI, S. & VIALE, G. – The clinical significance of p53 aberrations in human tumors. **Virchows Arch.**, **427**: 229-41, 1995.
- BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; SHAH, K.V.; MEHEUS, A. – Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. **Int. J. Cancer**, **52**: 171-3, 1992.
- BRINTON, L.A.; NASCA, P.C.; MALLIN, K.; BAPTISTE, M.S.; WILBANKS, G.D.; RICHART, R.M. – Case-control study of cancer of the vulva. **Obstet. Gynecol.**, **75**: 859-66, 1990.
- BRISIGOTTI, M.; MORENO, A.; MURCIA, C.; MATÍAS-GUIU, X.; PRAT, J. – Verrucous carcinoma of the vulva: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **8**: 1-7, 1989.

- BUCKLEY, C.H.; BUTLER, E.B.; FOX, H. – Vulvar intraepithelial neoplasia and microinvasive carcinoma of the vulva. **J. Clin. Pathol.**, **37**: 1201-11, 1984.
- BUSBY-EARLE, R.M.C.; STEEL, C.M.; WILLIAMS, A.R.W.; COHEN, B.; BIRD, C.C. – P53 mutation in cervical carcinogenesis: low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. **Br. J. Cancer**, **69**: 732-7, 1994.
- BUSCEMA, J.; NAGHASHFAR, Z.; SAWADA, E.; DANIEL, R.; WOODRUFF, J.D.; SHAH, K. – The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, **71**: 601-6, 1988.
- BUSCEMA, J.; STERN, J.L.; WOODRUFF, J.D. – Early invasive carcinoma of the vulva. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **140**: 563-9, 1981.
- CALZOLARI, A.; CHIARELLI, I.; BIANCHI, S.; MESSERINI, L.; GALLO, O.; PORFIRIO, B.; MATTIUZ, P.L. – Immunohistochemical vs molecular biology methods: complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. **Am. J. Clin. Pathol.**, **107**: 7-11, 1997.
- CARLI, P.; CATTANEO, A.; PIMPINELLI, N.; COZZA, A.; BRACCO, G.; GIANNOTTI, B. – Immunohistochemical evidence of skin immune system involvement in vulvar lichen sclerosus et atrophicus. **Dermatologica**, **182**: 18-22, 1991.
- CARLSON, J.A.; AMBROS, R.; MALFETANO, J.; ROSS, J.; GRABOWSKI, R.; LAMB, P.; FIGGE, H.; MIHM, M.C., Jr. – Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. **Hum. Pathol.**, **29**: 932-48, 1998.
- CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; OLIVEIRA, L.H.S. – Human papillomavirus infection: correlation of colposcopy, cytology, histopathology, and *in situ* hybridization. **J. Bras. Patol.**, **33**: 62-9, 1997.
- CAVANAGH, D. & HOFFMAN, M.S. – Controversies in the management of vulvar carcinoma. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **103**: 293-300, 1996.
- CHEUNG, A.N.Y.; KHOO, U.S.; KWONG, K.Y.; SRIVASTAVA, G.; COLLINS, R.J. – Epstein-Barr virus in carcinoma of the vulva. **J. Clin. Pathol.**, **46**: 849-51, 1993.
- CHO, K.R. & HEDRICK, L. – Molecular biology. In: KURMAN, R.J., ed. – **Blaunstein's pathology of the female genital tract**. 4.ed. New York, Springer-Verlag, 1994. p. 1173-98.

- CHOO, Y.C. – Invasive squamous carcinoma of the vulva in young patients. **Gynecol. Oncol.**, **13**: 158-64, 1982.
- COOPER, K.; HERRINGTON, C.S.; EVANS, M.F.; GATTER, K.C.; McGEE, J.O.D. – P53 antigen in cervical condylomata, intraepithelial neoplasia, and carcinoma: relationship to HPV infection and integration. **J. Pathol.**, **171**: 27-34, 1993.
- CORDON-CARDO, C. – Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia. **Am. J. Pathol.**, **143**: 545-60, 1995.
- COSTA, S.; ROTOLA, A.; TERZANO, P.; POGGI, M.G.; Di LUCA, D.; AURELIAN, L.; CASSAI, E.; ORLANDI, C. – Search for Herpes simplex virus 2 and human papillomavirus genetic expression in vulvar neoplasia. **J. Reprod. Med.**, **35**: 1108-12, 1990.
- COSTA, S.; SYRJÄNEN, S.; VENDRA, C.; CHANG, F.; GUIDA, G.; HIPPELÄINEN, M.; TERZANO, P.; TERVAHAUTA, A.; YLISKOSKI, M.; SYRJÄNEN, K. – Human papillomavirus infections in vulvar precancerous lesions and cancer. **J. Reprod. Med.**, **40**: 291-8, 1995.
- CREASMAN, W.T.; PHILLIPS, J.L.; MENCK, H.R. – The National Cancer Data Base report on early stage invasive vulvar carcinoma. **Cancer**, **80**: 505-13, 1997.
- CRUM, C.P. – Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. **Obstet. Gynecol.**, **79**: 448-54, 1992.
- CRUM, C.P. – Vulvar intraepithelial neoplasia: histology and associated viral changes. In: WILKINSON, E.J., ed. – **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 79-101. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).
- CRUM, C.P.; BRAUN, L.A.; SHAH, K.V.; FU, Y.S.; LEVINE, R.U.; FENOGLIO, C.M.; RICHART, R.M.; TOWNSEND, D.E. – Vulvar intraepithelial neoplasia: correlation of nuclear DNA content and the presence of a human papilloma virus (HPV) structural antigen. **Cancer**, **49**: 468-71, 1982a.
- CRUM, C.P. & BURKETT, B.J. – Papillomavirus and vulvovaginal neoplasia. **J. Reprod. Med.**, **34** (suppl. 8): 566-71, 1989.
- CRUM, C.P.; FU, Y.S.; LEVINE, R.U.; RICHART, R.M.; TOWNSEND, D.E.; FENOGLIO, C.M. – Intraepithelial squamous lesions of the vulva: biologic and histologic criteria for the distinction of condylomas from vulvar intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **144**: 77-83, 1982b.

- CRUM, C.P.; LISKOW, A.; PETRAS, P.; KENG, W.C.; FRICK II, H.C. – Vulvar intraepithelial neoplasia (severe atypia and carcinoma *in situ*): a clinicopathologic analysis of 41 cases. **Cancer**, **54**: 1429-34, 1984.
- DERCHAIN, S.F.M.; ANDRADE, L.A.L.A.; PINTO E SILVA, J.L.C.; PINTO NETO, A.M.; ARAUJO, S.F.; NEVES-JORGE, J.P. – Fatores de risco para condiloma do colo uterino em mulheres adolescentes sexualmente ativas. **Rev. Ass. Méd. Brasil**, **41**: 130-4, 1995.
- DERCHAIN, S.F.M.; VASSALLO, J.; PINTO, G.A.; IRAZUSTA, S.P.; ANDRADE, L.A.L.A. – Langerhans' cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia in smoking and non-smoking adolescents. **Acta Derm. Venereol. (Stockh)**, **76**: 493-4, 1996.
- DONALDSON, E.S.; POWELL, D.E.; HANSON, M.B.; van NAGEL, J.R. – Prognostic parameters in invasive vulvar cancer. **Gynecol. Oncol.**, **11**: 184-90, 1981.
- EDWARDS, C.L.; TORTOLERO-LUNA, G.; LINARES, A.C.; MALPICA, A.; BAKER, V.V.; COOK, E.; JOHNSON, E.; MITCHELL, M.F. – Vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar cancer. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, **23**: 295-324, 1996.
- ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; MEIJER, C.J.; WALBOOMERS, J.M. – Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **Br. J. Cancer**, **69**: 114-9.
- ENGELMAN, D.E.S. – **Carcinoma *in situ* e carcinoma escamoso superficialmente invasivo da vulva e sua associação com o vírus do papiloma humano: estudo pelas técnicas de imunoperoxidase e hibridização *in situ***. Campinas, 1994. [Tese de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas].
- FIRZLAFF, J.M.; KIVIAT, N.B.; BECKMANN, A.M.; JENISON, S.A.; GALLOWAY, D.A. – Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2 open reading frames. **Virology**, **164**: 467-77, 1988.
- FLEISS, J.L. – Combining evidence from fourfold tables. In: \_\_\_\_\_ – **Statistical methods for rates and proportions**. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc, 1981. p. 160-87.
- FRANCO, E.L.F. – Epidemiology of anogenital warts and cancer. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, **23**: 597-623, 1996.
- FU, Y.S. & REAGAN, J.W. – Benign and malignant epithelial tumors of the vulva. In: \_\_\_\_\_ – **Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1989. p. 138-92. (Major Problems in Pathology, 21).

- FU, Y.S.; REAGAN, J.W.; TOWNSEND, D.E.; KAUFMAN, R.H.; RICHART, R.M.; WENTZ, W.B. – Nuclear DNA study of vulvar intraepithelial and invasive squamous neoplasms. **Obstet. Gynecol.**, **57**: 643-52, 1981.
- GILES, G.G. & KNEALE, B.L.G. – Vulvar cancer: the Cinderella of gynaecological oncology. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**, **35**: 71-5, 1995.
- GÓMEZ, F.; CORCUERA, M.T.; MUÑOZ, E.; ROLDAN, M.; ALONSO, M.J.; ABOD, M.; PAZ, J.I.; LÓPEZ-BRAVO, A. – Diagnosis of genital infection caused by human papillomavirus using *in situ* hybridization: the importance of the size of the biopsy specimen. **J. Clin. Pathol.**, **48**: 57-8, 1995.
- GROSS, G. – Lesions of the male and female external genitalia associated with human papillomaviruses. In: SYRJÄNEN, K.; GISSMANN, L.; KOSS, L.G., ed. - **Papillomaviruses and human disease**. Berlin, Springer-Verlag, 1987. p. 197-234.
- GUARNER, J.; COHEN, C.; DeROSE, P.B. – Histogenesis of extramammary and mammary Paget cells: an immunohistochemical study. **Am. J. Dermatopathol.**, **11**: 313-8, 1989.
- GUIOT, Y. & RAHIER, J. – The effects of varying key steps in the non-radioactive *in situ* hybridization protocol: a quantitative study. **Histochem. J.**, **27**: 60-8, 1995.
- HACKER, N.F.; BEREK, J.S.; LAGASSE, L.D.; NIEBERG, R.K.; LEUCHTER, R.S. – Individualization of treatment for stage I squamous cell vulvar carcinoma. **Obstet. Gynecol.**, **63**: 155-62, 1984.
- HAEFNER, H.K.; TATE, J.E.; McLACHLIN, C.M.; CRUM, C.P. – Vulvar intraepithelial neoplasia: age, morphological phenotype, papillomavirus DNA, and coexisting invasive carcinoma. **Hum. Pathol.**, **26**: 147-54, 1995.
- HALL, P.A. & LANE, D.P. – P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? – revisited! **J. Pathol.**, **172**: 1-4, 1994. [Editorial]
- HELLAND, Å.; HOLM, R.; KRISTENSEN, G.; KAERN, J.; KARLSEN, F.; TROPE, C.; NESLAND, J.M.; BØRRESEN, A.L. – Genetic alterations of the TP53 gene, p53 protein expression and HPV infection in primary cervical carcinomas. **J. Pathol.**, **171**: 105-14, 1993.
- HEROD, J.J.O.; SHAFI, M.I.; ROLLASON, T.P.; JORDAN, J.A.; LUESLEY, D.M. – Vulvar intraepithelial neoplasia: long term follow up of treated and untreated women. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **103**: 446-52, 1996a.

- HEROD, J.J.O.; SHAFI, M.I.; ROLLASON, T.P.; JORDAN, J.A.; LUESLEY, D.M. – Vulvar intraepithelial neoplasia with superficially invasive carcinoma of the vulva. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **103**: 453-6, 1996b.
- HERRINGTON, C.S. – Human papillomaviruses and cervical neoplasia: II. Interaction of HPV with other factors. **J. Clin. Pathol.**, **48**: 1-6, 1995.
- HERRINGTON, C.S.; ANDERSON, S.M.; BAUER, H.M.; TRONCONE, G.; De ANGELIS, M.L.; NOELL, H.; CHIMERA, J.A.; van EYCK, S.L.; McGEE, J.O'D. – Comparative analysis of human papillomavirus detection by PCR and non-isotopic *in situ* hybridization. **J. Clin. Pathol.**, **48**: 415-9, 1995.
- HERRINGTON, C.S.; ANDERSON, S.M.; GRAHAM, A.K.; McGEE, J.O'D. – The discrimination of high-risk HPV types by *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction. **Histochem. J.**, **25**: 191-8, 1993.
- HICKS, M.L.; HEMPLING, R.E.; PIVER, M.S. – Vulvar carcinoma with 0.5 mm of invasion and associated inguinal lymph node metastasis. **J. Surg. Oncol.**, **54**: 271-3, 1993.
- HIETANEN, S.; GRÉNMAN, S.; SYRJÄNEN, K.; LAPPALAINEN, K.; KAUPPINEN, J.; CAREY, T.; SYRJÄNEN, S. – Human papillomavirus in vulvar and vaginal carcinoma cell lines. **Br. J. Cancer**, **72**: 134-9, 1995a.
- HIETANEN, S.H.; KURVINEN, K.; SYRJÄNEN, K.; GRÉNMAN, S.; CAREY, T.; McCLATCHEY, K.; SYRJÄNEN, S. – Mutation of tumor suppressor gene p53 is frequently found in vulvar carcinoma cells. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **173**: 1477-82, 1995b.
- HINES, J.F.; GHIM, S.; SCHLEGEL, R.; JENSON, A.B. – Prospects for a vaccine against human papillomavirus. **Obstet. Gynecol.**, **86**: 860-6, 1995.
- HÖEPFNER, I. & LÖNING, T. – Human papillomavirus (HPV) infection of cervical lesions detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **Cancer Detect. Prev.**, **9**: 293-301, 1986.
- HOFFMAN, J.S.; KUMAR, N.B.; MORLEY, G.W. – Microinvasive squamous carcinoma of the vulva: search for a definition. **Obstet. Gynecol.**, **61**: 615-8, 1983.
- HÖFLER, H. – What's new in "*in situ* hybridization". **Pathol. Res. Pract.**, **182**: 421-30, 1987.
- HOMESLEY, H.D. – Management of vulvar cancer. **Cancer**, **76**: 2159-70, 1995.

- HOPKINS, M.P.; REID, G.C.; VETTRANO, I.; MORLEY, G.W. – Squamous cell carcinoma of the vulva: prognostic factors influencing survival. **Gynecol. Oncol.**, **43**: 113-7, 1991.
- HØRDING, U.; DAUGAARD, S.; IVERSEN, A.K.N.; KNUDSEN, J.; BOCK, J.E.; NORRILD, B. – Human papillomavirus type 16 in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and associated cervical neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, **42**: 22-6, 1991.
- HØRDING, U.; JUNGE, J.; DAUGAARD, S.; LUNDEVALL, F.; POULSEN, H.; BOCK, J.E. – Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. **Gynecol. Oncol.**, **52**: 241-6, 1994.
- HØRDING, U.; JUNGE, J.; POULSEN, H.; LUNDEVALL, F. – Vulvar intraepithelial neoplasia III: a viral disease of undetermined progressive potential. **Gynecol. Oncol.**, **56**: 276-9, 1995.
- HØRDING, U.; KRINGSOLM, B.; ANDREASSON, B.; VISFELDT, J.; DAUGAARD, S.; BOCK, J.E. – Human papillomavirus in vulvar squamous-cell carcinoma and in normal vulvar tissues: a search for a possible impact of HPV on vulvar cancer prognosis. **Int. J. Cancer**, **55**: 394-6, 1993.
- HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S. – Introduction to the logistic regression model. In: \_\_\_\_\_ – **Applied logistic regression**. New York, John Wiley & Sons, Inc, 1989a. p. 1-24.
- HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S. – The multiple logistic regression model. In: \_\_\_\_\_ – **Applied logistic regression**. New York, John Wiley & Sons, Inc, 1989b. p. 25-37.
- HOTTA, E.H.; GONÇALVES, M.A.G.; LATORRE, M.R.D.O. – Estudo epidemiológico descritivo de 15 casos de câncer da vulva no período de 1978-1990. **J. Bras. Ginec.**, **104**: 397-9, 1994.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. – The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**: 816-21, 1981.
- HUSSEINZADEH, N.; DeEULIS, T.; NEWMAN, N.; WESSELER, T. – HPV changes and their significance in patients with invasive squamous cell carcinoma of the vulva: a clinicopathologic study. **Gynecol. Oncol.**, **43**: 237-41, 1991.
- HUSSEINZADEH, N.; NEWMAN, N.J.; WESSELER, T.A. – Vulvar intraepithelial neoplasia: a clinicopathological study of carcinoma *in situ* of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **33**: 157-63, 1989.

- IACOBELLIS, G.; MANZIONE, L.; LOMEIO, A.M. – Tumori maligni della vulva: incidenza e caratteristiche epidemiologiche. **Minerva Ginecol.**, **42**: 293-6, 1990.
- INOUE, M.; FUJITA, M.; ENOMOTO, T.; MORIMOTO, H.; MONDEN, T.; SHIMANO, T.; TANIZAWA, O. – Immunohistochemical analysis of p53 in gynecologic tumors. **Am. J. Clin. Pathol.**, **102**: 665-70, 1994.
- ISHIZAWA, T.; MITSUHASHI, Y.; SUGIKI, H.; HASHIMOTO, H.; KONDO, S. – Basal cell carcinoma within vulvar Paget's disease. **Dermatology**, **197**: 388-90, 1998.
- ITALIAN STUDY GROUP ON VULVAR DISEASE – Clinicopathologic analysis of 370 cases of vulvar intraepithelial neoplasia. **J. Reprod. Med.**, **41**: 665-70, 1996.
- IVERSEN, T.; ABELER, V.; AALDERS, J. – Individualized treatment of stage I carcinoma of the vulva. **Obstet. Gynecol.**, **57**: 85-9, 1981.
- IVERSEN, T. & TRETTLI, S. – Intraepithelial and invasive squamous cell carcinoma of the vulva: trends in incidence, recurrence, and survival rates in Norway. **Obstet. Gynecol.**, **91**: 969-72, 1998.
- IWASAWA, A.; NIEMINEN, P.; LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J. – Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. **Obstet. Gynecol.**, **89**: 81-4, 1997.
- JONES, R.W. – The natural history of vulvar intraepithelial neoplasia. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **102**: 764-6, 1995.
- JONES, R.W.; BARANYAI, J.; STABLES, S. – Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, **90**: 448-52, 1997.
- JONES, R.W.; PARK, J.S.; McLEAN, M.R.; SHAH, K.V. – Human papillomavirus in women with vulvar intraepithelial neoplasia III. **J. Reprod. Med.**, **35**: 1124-6, 1990.
- JONES, R.W. & ROWAN, D.M. – Vulvar intraepithelial neoplasia III: a clinical study of the outcome in 113 cases with relation to the later development of invasive vulvar carcinoma. **Obstet. Gynecol.**, **84**: 741-5, 1994.
- JUNGE, J.; POULSEN, H.; HORN, T.; HØRDING, U.; LUNDEVALL, F. – Human papillomavirus (HPV) in vulvar dysplasia and carcinoma *in situ*. **APMIS**, **103**: 501-10, 1995.
- JUNGE, J.; POULSEN, H.; HORN, T.; HØRDING, U.; LUNDEVALL, F. – Prognosis of vulvar dysplasia and carcinoma *in situ* with special reference to histology and types of human papillomavirus (HPV). **APMIS**, **105**: 963-71, 1997.

- KAGIE, M.J.; KENTER, G.G.; TOLLENAAR, R.A.E.M.; HERMANS, J.; TRIMBOS, J.B.; FLEUREN, G.J. – P53 protein overexpression, a frequent observation in squamous cell carcinoma of the vulva and in various synchronous vulvar epithelia, has no value as a prognostic parameter. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **16**: 124-30, 1997a.
- KAGIE, M.J.; KENTER, G.G.; TOLLENAAR, R.A.E.M.; HERMANS, J.; TRIMBOS, J.B.; FLEUREN, G.J. – P53 protein overexpression is independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. **Cancer**, **80**: 1228-33, 1997b.
- KAGIE, M.J.; KENTER, G.G.; ZOMERDIJK-NOOIJEN, Y.; HERMANS, J.; SCHUURING, E.; TIMMERS, P.J.; TRIMBOS, J.B.; FLEUREN, G.J. – Human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva, in various synchronous epithelial changes and in normal vulvar skin. **Gynecol. Oncol.**, **67**: 178-83, 1997c.
- KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; CHITEMERERE, M.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. – Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. **Lab. Invest.**, **71**: 604-11, 1994.
- KAUFMAN, R.H. – Intraepithelial neoplasia of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **56**: 8-21, 1995.
- KELLEY III, J.L.; BURKE, T.W.; TORNOS, C.; MORRIS, M.; GERSHENSON, D.M.; SILVA, E.G.; WHARTON, J.T. – Minimally invasive vulvar carcinoma: an indication for conservative surgical therapy. **Gynecol. Oncol.**, **44**: 240-4, 1992.
- KEY, M.E. & PHILLIPS, T. – Catalysed signal amplification (CSA): an enhanced immunohistochemical staining method based on biotinyl tyramide. **J. NIH Res.**, **8**: 72, 1996.
- KIM, J.W.; CHO, Y.H.; LEE, C.G.; KIM, J.H.; KIM, H.K.; KIM, E.J.; HAN, K.T.; NAMKOONG, S.E. – Human papillomavirus infection and TP53 gene mutation in primary cervical carcinoma. **Acta Oncol.**, **36**: 295-300, 1997.
- KIM, Y-T.; THOMAS, N.F.; KESSIS, T.D.; WILKINSON, E.J.; HEDRICK, L.; CHO, K.R. – P53 mutations and clonality in vulvar carcinomas and squamous hyperplasias: evidence suggesting that squamous hyperplasias do not serve as direct precursors of human papillomavirus-negative vulvar carcinomas. **Hum. Pathol.**, **27**: 389-95, 1996.
- KIRSCHNER, C.V.; YORDAN, E.L.; De GEEST, K.; WILBANKS, G.D. – Smoking, obesity, and survival in squamous cell carcinoma of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **56**: 79-84, 1995.

- KLUZAC, T.R. & KRAUS, F.T. – Condylomata, papillomas, and verrucous carcinomas of the vulva and vagina. In: WILKINSON, E.J., ed. – **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 49-77. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).
- KODAMA, S.; KANEKO, T.; SAITO, M.; YOSHIYA, N.; HONMA, S.; TANAKA, K. – A clinicopathologic study of 30 patients with Paget's disease of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **56**: 63-70, 1995.
- KODAMA, S.; OBATA, N.; HANDO, T.; GOTO, A.; IKARASHI, T.; TAKEUCHI, S.; SASAGAWA, S.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, T.; KATO, M. – A clinicopathological study of 11 patients with Paget's disease of the vulva. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, **37**: 861-70, 1985. [Abstract]
- KOHLBERGER, P.; KAINZ, C.; BREITENECKER, G.; GITSCH, G.; SLIUTZ, G.; KÖLBL, U.; TSCHACHLER, E.; REINTHALLER, A. – Prognostic value of immunohistochemically detected p53 expression in vulvar carcinoma. **Cancer**, **76**: 1786-9, 1995.
- KOHLBERGER, P.D.; KIRNBAUER, R.; BANCHER, D.; GITSCH, G.; REINTHALLER, A.; LEODOLTER, S.; TSCHACHLER, E.; KAINZ, C.; BREITENECKER, G. – Absence of p53 protein overexpression in precancerous lesions of the vulva. **Cancer**, **82**: 323-7, 1998.
- KÜPPERS, V.; STILLER, M.; SOMVILLE, T.; BENDER, H.G. – Risk factors for recurrent VIN: role of multifocality and grade disease. **J. Reprod. Med.**, **42**: 140-4, 1997.
- KURMAN, R.J.; NORRIS, H.J.; WILKINSON, E.J. – Tumors of the vulva. In: \_\_\_\_\_ - **Tumors of the cervix, vagina, and vulva**. 3.ed. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p. 179-255. (Atlas of Tumor Pathology, 4).
- KURMAN, R.J.; TOKI, T.; SCHIFFMAN, M.H. – Basaloid and warty carcinomas of the vulva: distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. **Am. J. Surg. Pathol.**, **17**: 133-45, 1993.
- KÜRZL, R.; MESSERER, D.; BALTZER, J.; LOHE, K.J.; ZANDER, J. – Comparative morphometric study on the depth of invasion in vulvar carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **29**: 12-25, 1988.
- LAMBKIN, H.A.; MOTHERSILL, C.M.; KELEHAN, P. – Variations in immunohistochemical detection of p53 protein overexpression in cervical carcinomas with different antibodies and methods of detection. **J. Pathol.**, **172**: 13-8, 1994.

- LeBOIT, P.E.; CRUTCHER, W.A.; SHAPIRO, P.E. – Pagetoid intraepidermal spread in Merkel cell (primary neuroendocrine) carcinoma of the skin. **Am. J. Surg. Pathol.**, **16**: 584-92, 1992.
- LEE, Y.Y.; WILCZYNSKI, S.P.; CHUMAKOV, A.; CHIH, D.; KOFFLER, U.P. – Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. **Oncogene**, **9**: 1655-9, 1994.
- LIE, A.K.; SKJELDESTAD, F.E.; HAGEN, B.; JOHANNESSEN, E.; SKARSVÅG, S.; HAUGEN, O.A. – Comparison of light microscopy, *in situ* hybridization and polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus in histological tissue of cervical intraepithelial neoplasia. **APMIS**, **105**: 115-20, 1997.
- LINDEN, M.D.; NATHANSON, S.D.; ZARBO, R.J. – Evaluation of anti-p53 antibody staining immunoreactivity in benign tumors and nonneoplastic tissues. **Appl. Immunohistochem.**, **3**: 232-8, 1995.
- LINGARD, D.; FREE, K.; WRIGHT, R.G.; BATTISTUTTA, D. – Invasive squamous cell carcinoma of the vulva: behavior and results in the light of changing management regimens. A review of clinicohistological features predictive of regional lymph node involvement and local recurrence. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**, **32**: 137-45, 1992.
- LIU, Z.; GHAI, J.; OSTROW, R.S.; FARAS, A.J. – The expression levels of the human papillomavirus type 16 E7 correlate with its transforming potential. **Virology**, **207**: 260-70, 1995.
- MABUCHI, K.; BROSS, D.S.; KESSLER, I.I. – Epidemiology of cancer of the vulva: a case-control study. **Cancer**, **55**: 1843-8, 1985.
- MAJEWSKI, S. & JABLONSKA, S. – Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **36**: 659-85, 1997.
- MALFETANO, J.H.; PIVER, M.S.; TSUKADA, Y.; REESE, P. – Univariate and multivariate analysis of 5-year survival, recurrence, and inguinal node metastases in stage I and II vulvar carcinoma. **J. Surg. Oncol.**, **30**: 124-31, 1985.
- McCONNELL, D.T.; MILLER, I.D.; PARKIN, D.E.; MURRAY, G.I. – P53 protein expression in a population-based series of primary vulval squamous cell carcinoma and immediate adjacent field change. **Gynecol. Oncol.**, **67**: 248-54, 1997.
- MENCZER, J.; VOLIOVITCH, Y.; MODAN, B.; MODAN, M.; STEINITZ, R. – Some epidemiologic aspects of carcinoma of the vulva in Israel. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **143**: 893-6, 1982.

- MESSING, M.J. & GALLUP, D.G. – Carcinoma of the vulva in young women. **Obstet. Gynecol.**, **86**: 51-4, 1995.
- MILDE-LANGOSCH, K.; ALBRECHT, K.; JORAM, S.; SCHLECHTE, H.; GIESSING, M.; LÖNING, T. – Presence and persistence of HPV infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva. **Int. J. Cancer**, **63**: 639-45, 1995.
- MILDE-LANGOSCH, K.; BECKER, G.; LÖNING, T. – Human papillomavirus and *c-myc/c-erbB2* in uterine and vulvar lesions. **Virchows Arch.**, **419**: 479-85, 1991.
- MITCHELL, M.F.; PRASAD, C.J.; SILVA, E.G.; RUTLEDGE, F.N.; McARTHUR, M.C.; CRUM, C.P. – Second genital primary squamous neoplasms in vulvar carcinoma: viral and histopathologic correlates. **Obstet. Gynecol.**, **81**: 13-8, 1993.
- MIWA, K.; MIYAMOTO, S.; KATO, H.; IMAMURA, T.; NISHIDA, M.; YOSHIKAWA, Y.; NAGATA, Y.; WAKE, N. – The role of p53 inactivation in human cervical cell carcinoma development. **Br. J. Cancer**, **71**: 219-26, 1995.
- MONK, B.J.; BURGER, P.A.; LIN, F.; PARHAM, G.; VASILEY, S.A.; WILCZYNSKI, S.P. – Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. **Obstet. Gynecol.**, **85**: 709-15, 1995.
- NAGAI, N.; NUOVO, G.; FRIEDMAN, D.; CRUM, C.P. – Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the *in situ* hybridization technique. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **6**: 366-79, 1987.
- NEILL, S.M.; LESSANA-LEIBOWITCH, M.; PELISSE, M.; MOYAL-BARRACCO, M. – Lichen sclerosus, invasive squamous cell carcinoma, and human papillomavirus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **162**: 1633-4, 1990. [Letter]
- NILSSON, T.; ALM, P.; MALMSTRÖM, H.; SIMONSEN, E.; TROPÉ, C. – A 16-year-old girl with invasive carcinoma of the vulva. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **69**: 541-2, 1990.
- NUOVO, G.J. – Molecular biology for the pathologist. In: \_\_\_\_\_ – **Cytopathology of the lower female genital tract: an integrated approach**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994. p. 133-54.
- NUOVO, G.J.; DARFLER, M.M.; IMPRAIM, C.C.; BROMLEY, S.E. – Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions: analysis by *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction. **Am. J. Pathol.**, **138**: 53-8, 1991a.
- NUOVO, G.J.; DELVENNE, P.; MacCONNELL, P.; CHALAS, E.; NETO, C.; MANN, W.J. – Correlation of histology and detection of human papillomavirus DNA in vulvar cancers. **Gynecol. Oncol.**, **43**: 275-80, 1991b.

- NUOVO, G.J. & RICHART, R.M. – A comparison of different *in situ* hybridization methodologies (biotin-based and <sup>35</sup>S-based) for the detection of human papillomavirus DNA. **Lab. Invest.**, **61**: 471-6, 1989. [Editorial]
- OGUNBIYI, O.A.; SCHOLEFIELD, J.H.; ROBERTSON, G.; SMITH, J.H.F.; SHARP, F.; ROGERS, K. – Anal human papillomavirus infection and squamous neoplasia in patients with invasive vulvar cancer. **Obstet. Gynecol.**, **83**: 212-6, 1994.
- OKAGAKI, T. – Female genital tumors associated with human papillomavirus infection, and the concept of genital neoplasm-papilloma syndrome (GENPS). **Pathol. Annu.**, **19**: 31-62, 1984.
- PARAZZINI, F.; MORONI, S.; NEGRI, E.; La VECCHIA, C.; DAL PINO, D.; CAVALLERI, E. – Selected food intake and risk of vulvar cancer. **Cancer**, **76**: 2291-6, 1995.
- PARK, T.W.; FUJIWARA, H.; WRIGHT, T.C. – Molecular biology of cervical cancer and its precursors. **Cancer**, **76**: 1902-13, 1995.
- PARK, J.S.; JONES, R.W.; McLEAN, M.R.; CURRIE, J.L.; WOODRUFF, J.D.; SHAH, K.V.; KURMAN, R.J. – Possible etiologic heterogeneity of vulvar intraepithelial neoplasia: a correlation of pathologic characteristics with human papillomavirus detection by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. **Cancer**, **67**: 1599-607, 1991a.
- PARK, J.S.; RADER, J.S.; WU, T.C.; LAIMINS, L.A.; CURRIE, J.L.; KURMAN, R.J.; SHAH, K.V. – HPV-16 viral transcripts in vulvar neoplasia: preliminary studies. **Gynecol. Oncol.**, **42**: 250-5, 1991b.
- PILERI, S.A.; RONCADOR, G.; CECCARELLI, C.; PICCIOLI, M.; BRISKOMATIS, A.; SABATTINI, E.; ASCANI, S.; SANTINI, D.; PICCALUGA, P.P.; LEONE, O.; DAMIANI, S.; ERCOLESSI, C.; SANDRI, F.; PIERI, F.; LEONCINI, L.; FALINI, B. – Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. **J. Pathol.**, **183**: 116-23, 1997.
- PILOTTI, S.; D'AMATO, L.; DELLA TORRE, G.; DONGHI, R.; LANGONI, A.; GIAROLA, M.; SAMPIETRO, G.; De PALO, G.; PIEROTTI, M.A.; RILKE, F. – Papillomavirus, p53 alteration, and primary carcinoma of the vulva. **Diagn. Mol. Pathol.**, **4**: 239-48, 1995.
- PILOTTI, S.; DONGHI, R.; D'AMATO, L.; GIAROLA, M.; LONGONI, A.; DELLA TORRE, G.; De PALO, G.; PIEROTTI, M.A.; RILKE, F. – HPV detection and p53 alteration in squamous cell verrucous malignancies of the lower genital tract. **Diagn. Mol. Pathol.**, **2**: 248-56, 1993a.

- PILOTTI, S.; DONGHI, R.; D'AMATO, L.; GIAROLA, M.; LANGONI, A.; DELLA TORRE, G.; De PALO, G.; PIEROTTI, M.A.; RILKE, F. – Papillomavirus, p53 alteration and primary carcinoma of the vulva. **Eur. J. Cancer**, 6: 924-5, 1993b. [Letter]
- PILOTTI, S.; GUPTA, J.; STEFANON, B.; De PALO, G.; SHAH, K.V.; RILKE, F. – Study of multiple human papilloma-virus-related lesions of the lower female genital tract by *in situ* hybridization. **Hum. Pathol.**, 20: 118-23, 1989.
- PILOTTI, S.; RILKE, F.; SHAH, K.V.; DELLA TORRE, G.; De PALO, G. – Immunohistochemical and ultrastructural evidence of papilloma virus infection associated with *in situ* and microinvasive squamous cell carcinoma of the vulva. **Am. J. Surg. Pathol.**, 8: 751-61, 1984.
- PINTO, A.P. – **Influência da presença de DNA de papilomavírus e de achados anatomopatológicos no prognóstico do carcinoma escamoso vulvar.** São Paulo, 1999. [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo].
- PINTO, A.P.; LIN, M.C.; MUTTER, G.L.; SUN, D.; VILLA, L.L.; CRUM, C.P. – Allelic loss in human papillomavirus-positive and -negative vulvar squamous cell carcinomas. **Am. J. Pathol.**, 154: 1009-15, 1999.
- PINTO, A.P.; LIN, M.C.; SHEETS, E.E.; MUTO, M.G.; SUN, D.; CRUM, C.P. – Allelic imbalance in lichen sclerosus, hyperplasia, and intraepithelial neoplasia of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, 77: 171-6, 2000.
- PIURA, B.; RABINOVICH, A.; COHEN, Y.; FRIGER, M.; GLEZERMAN, M. – Squamous cell carcinoma of the vulva in the South of Israel: a study of 50 cases. **J. Surg. Oncol.**, 67: 174-81, 1998.
- PODCZASKI, E.; SEXTON, M.; KAMINSKI, P.; SINGAPURI, K.; SOROSKY, J.; LARSON, J.; MORTEL, R. – Recurrent carcinoma of the vulva after conservative treatment for "microinvasive" disease. **Gynecol. Oncol.**, 39: 65-8, 1990.
- PONTÉN, J.; ADAMI, H.O.; FRIBERG, L.G.; GUSTAFSSON, L.; MILLER, A.B.; PARKIN, M.; SPARÉN, P.; TRICHOPOULOS, D. – HPV and vulvar cancer. **Int. J. Cancer**, 63: 317, 1995. [Letter]
- PORTER, P.L.; GOWN, A.M.; KRAMP, S.G.; COLTRERA, M.D. – Widespread p53 overexpression in human malignant tumors: an immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. **Am. J. Pathol.**, 140: 145-53, 1992.
- POWELL, L.C., Jr.; DINH, T.V.; RAJARAMAN, S.; HANNIGAN, E.V.; DILLARD, E.A., Jr.; YANDELL, R.B.; TO, T. – Carcinoma *in situ* of the vulva: a clinicopathologic study of 50 cases. **J. Reprod. Med.**, 31: 808-14, 1986.

- PRAT, J. – Pathology of vulvar intraepithelial lesions and early invasive carcinoma. **Hum. Pathol.**, **22**: 877-83, 1991.
- PRETI, M.; MICHELETTI, L.; BARBERO, M.; GHIRINGHELLO, B.; VALENTINO, M.C.Z.; NICOLACI, P.; CANNI, M.; BORGNO, G.; SEGNAN, N.; RONCO, G. – Histologic parameters of vulvar invasive carcinoma and lymph node metastases. **J. Reprod. Med.**, **38**: 28-32, 1993.
- REID, R.; GREENBERG, M.D.; JENSON, A.B.; HUSEIN, M.; WILLET, J.; DAUD, Y.; TEMPLE, G.; STANHOPE, C.R.; SHERMAN, A.I.; PHIBBS, G.D.; LÖRINCZ, A.T. – Sexually transmitted papillomaviral infections: the anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **156**: 212-22, 1987.
- RESNICK, J.M.; CHERWITZ, D.; KNAPP, D.; UHLMAN, D.; NIEHANS, G.A. – A microwave method that enhances detection of aberrant p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **119**: 360-6, 1995.
- RIDLEY, C.M. – The aetiology of vulval neoplasia. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **101**: 655-7, 1994.
- ROMAN, A. & FIFE, K.H. – Human papillomaviruses: are we ready to type? **Clin. Microbiol. Rev. Apr.**, **2**: 166-90, 1989.
- ROMAN, L.D.; MITCHELL, M.F.; BURKE, T.W.; SILVA, E.G. – Unsuspected invasive squamous cell carcinoma of the vulva in young women. **Gynecol. Oncol.**, **41**: 182-5, 1991.
- ROSÉN, C. & MALMSTRÖM, H. – Invasive cancer of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **65**: 213-7, 1997.
- ROSS, M.J. & EHRMANN, R.L. – Histologic prognosticators in stage I squamous cell carcinoma of the vulva. **Obstet. Gynecol.**, **70**: 774-84, 1987.
- RUEDA-LEVERONE, N.G.; Di PAOLA, G.R.; MEISS, R.P.; VIGHI, S.G.; LLAMOSAS, F. – Association of human papillomavirus infection and vulvar intraepithelial neoplasia: a morphological and immunohistochemical study of 30 cases. **Gynecol. Oncol.**, **26**: 331-9, 1987.
- RUEDA, N.G.; GARCÍA, A.; VIGHI, S.; BELARDI, M.G.; CARDINAL, L.; Di PAOLA, G. – Epithelial alterations adjacent to invasive squamous carcinoma of the vulva. **J. Reprod. Med.**, **39**: 526-30, 1994a.

- RUEDA, N.G.; VIGHI, S.; GARCIA, A.; CARDINAL, L.; BELARDI, M.G.; Di PAOLA, G. – Histologic predictive factors: therapeutic impact in vulvar cancer. **J. Reprod. Med.**, **39**: 71-6, 1994b.
- SAGERMAN, P.M.; CHOI, Y.J.; HU, Y.; NIEDT, G.W. – Human papilloma virus, vulvar dystrophy, and vulvar carcinoma: differential expression of human papillomavirus and vulvar dystrophy in the presence and absence of squamous cell carcinoma of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **61**: 328-32, 1996.
- SCHEFFNER, M.; MÜNGER, K.; BYRNE, J.C.; HOWLEY, P.M. – The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 5523-7, 1991.
- SCHIFFMAN, M.H. & BRINTON, L.A. – Epidemiology. In: KURMAN, R.J., ed. – **Blaunstein's pathology of the female genital tract**. 4.ed. New York, Springer-Verlag, 1994. p. 1199-223.
- SCHIFFMAN, M.H. & BRINTON, L.A. – The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer**, **76**: 1888-901, 1995.
- SCULLY, R.E.; BONFIGLIO, T.A.; KURMAN, R.J.; SILVERBERG, S.G.; WILKINSON, E.J. – **Histological typing of female genital tract tumours**. 2.ed. Berlin, Springer-Verlag, 1994. 189p. (World Health Organization – International Histological Classification of Tumours).
- SEDLIS, A.; HOMESLEY, H.; BUNDY, B.N.; MARSHALL, R.; YORDAN, E.; HACKER, N.; LEE, J.H.; WHITNEY, C. – Positive groin lymph nodes in superficial squamous cell vulvar cancer: a gynecologic oncology group study. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **156**: 1159-64, 1987.
- SHERMAN, K.J.; DALING, J.R.; CHU, J.; WEISS, N.S.; ASHLEY, R.L.; COREY, L. – Genital warts, other sexually transmitted diseases, and vulvar cancer. **Epidemiology**, **2**: 257-62, 1991.
- SHERMAN, K.J.; DALING, J.R.; McKNIGHT, B.; CHU, J. – Hormonal factors in vulvar cancer: a case-control study. **J. Reprod. Med.**, **39**: 857-61, 1994.
- SLAGLE, B.L.; KAUFMAN, R.H.; REEVES, W.C.; ICENOGLE, J.P. – Expression of *ras*, *c-myc*, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer**, **83**: 1401-8, 1998.
- SLIUTZ, G.; SCHMIDT, W.; TEMPFER, C.; SPEISER, P.; GITSCH, G.; EDER, S.; SCHNEEBERGER, C.H.; KAINZ, C.H.; ZEILLINGER, R. – Detection of p53 point mutations in primary human vulvar cancer by PCR and temperature gradient gel electrophoresis. **Gynecol. Oncol.**, **64**: 93-8, 1997.

- SNOW, S.N.; DESOUKY, S.; LO, J.S.; KURTYCZ, D. – Failure to detect human papillomavirus DNA in extramammary Paget's disease. **Cancer**, **69**: 249-51, 1992.
- SOINI, Y.; PÄÄKKÖ, P.; VÄHÄKANGAS, K.; VUOPALA, S.; LEHTO, V.P. – Expression of p53 and proliferating cell nuclear antigen in lichen sclerosus et atrophicus with different histological features. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **13**: 199-204, 1994.
- SOLER, C.; CHARDONNET, Y.; GUERIN-REVERCHON, I.; CHIGNOL, M.C.; VIAC, J.; EUVRARD, S.; THIVOLET, J. – Influence of fixation on human papillomavirus DNA detection in frozen and embedded paraffin lesions by *in situ* hybridization with biotinylated probes. **Path. Res. Pract.**, **188**: 1018-27, 1992.
- SONNEX, C. – Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. **J. Clin. Pathol.**, **51**: 643-8, 1998.
- STEHMAN, F.B.; BUNDY, B.N.; DVORETSKY, P.M.; CREASMAN, W.T. – Early stage I carcinoma of the vulva treated with ipsilateral superficial inguinal lymphadenectomy and modified radical hemivulvectomy: a prospective study of the Gynecologic Oncology Group. **Obstet. Gynecol.**, **79**: 490-7, 1992.
- STURGEON, S.R.; BRINTON, L.A.; DEVESA, S.S.; KURMAN, R.J. – In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973 to 1987). **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **166**: 1482-5, 1992.
- STURGEON, S.R.; ZIEGLER, R.G.; BRINTON, L.A.; NASCA, P.C.; MALLIN, K.; GRIDLEY, G. – Diet and the risk of vulvar cancer. **Ann. Epidemiol.**, **1**: 427-37, 1991.
- SUTTON, G.P.; STEHMAN, F.B.; EHRLICH, C.E.; ROMAN, A. – Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in lesions of the female genital tract: evidence for type 6/11 in squamous carcinoma of the vulva. **Obstet. Gynecol.**, **70**: 564-8, 1987.
- SYRJÄNEN, S.M. – Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infections. **APMIS**, **98**: 95-110, 1990.
- SWAN, D.C.; VERNON, S.D.; ICENOGLE, J.P. – Cellular proteins involved in papillomavirus-induced transformation. **Arch. Virol.**, **138**: 105-15, 1994.
- TAN, S-H.; DERRICK, E.; MCKEE, P.H.; HOBBS, C.; RIDLEY, M.; NEILL, S. – Altered p53 expression and epidermal cell proliferation is seen in vulval lichen sclerosus. **J. Cutan. Pathol.**, **21**: 316-23, 1994.

- TATE, J.E.; MUTTER, G.L.; BOYNTON, K.A.; CRUM, C.P. – Monoclonal origin of vulvar intraepithelial neoplasia and some vulvar hyperplasias. **Am. J. Pathol.**, **150**: 315-22, 1997.
- TATE, J.E.; MUTTER, G.L.; PRASAD, C.J.; BERKOWITZ, R.; GOODMAN, H.; CRUM, C.P. – Analysis of HPV-positive and -negative vulvar carcinomas for alterations in *c-myc*, *Ha-*, *Ki-*, and *N-ras* genes. **Gynecol. Oncol.**, **53**: 78-83, 1994.
- TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; CHAIWUN, B.; YOUNG, L.; IMAM, S.A.; COSTA, R.J. – Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. **Hum. Pathol.**, **25**: 263-70, 1994.
- ter HARMSEL, B.; van BELKUM, A.; QUINT, W.; PRONK, A.; KUIJPERS, J.; RAMAEKERS, F.; TANDON, A.; SMEDTS, F. – P53 and human papilloma virus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **14**: 125-33, 1995.
- TERVAHAUTA, A.I.; SYRJÄNEN, S.M.; VÄYRYNEN, M.; SAASTAMOINEN, J.; SYRJÄNEN, K.J. – Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus (HPV) DNA in genital carcinomas and precancer lesions. **Anticancer Res.**, **13**: 1107-11, 1993.
- TOKI, T.; KURMAN, R.J.; PARK, J.S.; KESSIS, T.; DANIEL, R.W.; SHAH, K.V. – Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **10**: 107-25, 1991.
- TRIBBIA, G.; PEZZICA, E.; BUZZI, A.; SONZOGNI, A.; CRESCINI, C. – Alterazioni epiteliali associate al carcinoma epidermoide invasivo della vulva. **Minerva Ginecol.**, **47**: 531-4, 1995.
- TRIMBLE, C.L.; HILDENSHEIM, A.; BRINTON, L.A.; SHAH, K.V.; KURMAN, R.J. – Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. **Obstet. Gynecol.**, **87**: 59-64, 1996.
- TWIGGS, L.B.; OKAGAKI, T.; CLARK, B.; FUKUSHIMA, M.; OSTROW, R.; FARAS, A. – A clinical, histopathologic, and molecular biologic investigation of vulvar intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **7**: 48-55, 1988.
- van BEURDEN, M.; ten KATE, F.W.J.; SMITS, H.L.; BERKHOUT, R.J.M.; De CRAEN, A.J.M.; van der VANGE, N.; LAMMES, F.B.; ter SCHEGGET, J. – Multifocal vulvar intraepithelial neoplasia grade III and multicentric lower genital tract neoplasia is associated with transcriptionally active human papillomavirus. **Cancer**, **75**: 2879-84, 1995.

- van BEURDEN, M.; ten KATE, F.W.J.; TJONG, A.; HUNG, S.P.; De CRAEN, A.J.M.; van der VANGE, N.; LAMMES, F.B.; ter SCHEGGET, J. – Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **17**: 12-6, 1998.
- van HOEVEN, K.H. & KOVATICH, A.J. – Immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen, BCL2, and Ki-67 in vulvar tissues. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **15**: 10-6, 1996.
- van der VELDEN, J.; van LINDERT, A.C.M.; GIMBRERE, C.H.F.; OOSTING, H.; HEINTZ, A.P.M. – Epidemiologic data on vulvar cancer: comparison of hospital with population-based data. **Gynecol. Oncol.**, **62**: 379-83, 1996.
- VASSALLO, J.; DERCHAIN, S.F.M.; PINTO, G.A.; MARTINEZ, E.Z.; SYRJÄNEN, K.J.; ANDRADE, L.A.L.A. – High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, **71**: 45-8, 2000.
- VECCHIONE, A.; CERMELE, C.; GIOVAGNOLI, M.R.; VALLI, C.; ALIMANDI, M.; CARICO, E.; ESPOSITO, D.L.; MARIANI-CONSTANTINI, R.; FRENCH, D. – P53 expression and genetic evidence for viral infection in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, **55**: 343-8, 1994.
- VELCULESCU, V.E. & EL-DEIRY, W.S. – Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. **Clin. Chem.**, **42**: 858-68, 1996.
- VOOG, E. – Genital viral infections: studies on human papillomavirus and Epstein-Barr virus. **Acta Derm. Venereol.**, (suppl. 198), 1996.
- VOUSDEN, K.H. – Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. **Adv. Cancer Res.**, **64**: 1-24, 1994.
- VUOPALA, S.; PÖLLÄNEN, R.; KAUPPILA, A.; LEHTO, V.P. – Detection and typing of human papillomavirus infection affecting the cervix, vagina and vulva. **Arch. Gynecol. Obstet.**, **253**: 75-83, 1993.
- WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUÑOZ, N. – Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, **189**: 12-9.
- WALKER, J.; BLOSS, J.D.; LIAO, S.Y.; BERMAN, M.; BERGEN, S.; WILCZYNSKI, S.P. – Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. **Obstet. Gynecol.**, **74**: 781-5, 1989.

- WALTS, A.E.; KOEFFLER, H.P.; SAID, J.W. – Localization of p53 protein and human papillomavirus in anogenital squamous lesions: immunohistochemical and *in situ* hybridization studies in benign, dysplastic, and malignant epithelia. **Hum. Pathol.**, **24**: 1238-42, 1993.
- WIKSTRÖM, A. – Clinical and serological manifestations of genital human papillomavirus infection. **Acta Derm. Venereol.**, (suppl. 193), 1995.
- WILBUR, D.C.; REICHMAN, R.C.; STOLER, M.H. – Detection of infection by human papillomavirus in genital condylomata: a comparison study using immunocytochemistry and *in situ* nucleic acid hybridization. **Am. J. Clin. Pathol.**, **89**: 505-10, 1988.
- WILKINSON, E.J. – Superficial invasive carcinoma of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **28**: 188-95, 1985.
- WILKINSON, E.J. – Superficially invasive carcinoma of the vulva. In: \_\_\_\_\_ - **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 103-17. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).
- WILKINSON, E.J. – Superficially invasive carcinoma of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **34**: 651-61, 1991.
- WILKINSON, E.J. – The 1989 Presidential Address: International Society for the Study of Vulvar Disease. **J. Reprod. Med.**, **35**: 981-91, 1990.
- WOODRUFF, J.D. – Carcinoma *in situ* of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **28**: 230-9, 1985.
- WOODRUFF, J.D. – Carcinoma *in situ* of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **34**: 669-76, 1991.
- ZAINO, R.J. – Carcinoma of the vulva, urethra, and Bartholin's glands. In: WILKINSON, E.J., ed. – **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 119-53. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).
- ZARCONE, R.; CARDONE, G.; VOTO, R.I.; PALUMBO, S.; CARDONE, A. – Distrofie e VIN. **Minerva Ginecol.**, **43**: 43-5, 1991.

# ANEXO I

## RELAÇÃO GLOBAL DOS DADOS ENCONTRADOS

### 1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III (NIV III)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material           | Doença TGF associada                              | Aspecto macroscópico das lesões   | Localização das lesões           | Lesões únicas ou múltiplas | Variante histológica | Colocidade                          | Extensão para anexos | Epitélio adjacente            | IHQ HPV                            | HIS e tipo de HPV  | IHQ p53   |
|----------------|--------------|-------|--------------------|---|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|-----------|
| 1              | 35           | b     | biópsia            | condiloma de vagina                               | verrucosa                         | -                                | -                          | bowenóide            | -                                   | -                    | -                             | -                                  | +++ NIV III<br>WS e 16/18                                  | -         |
| 2*             | 60           | pd    | ressecação         | condiloma no colo                                 | hipercrômica<br>2x1 cm            | grandes lábios D e E;<br>fúrcula | M                          | basalóide            | +<br>(ep. atípico)                  | -                    | -                             | -                                  | -  | -         |
| 3              | 39           | b     | ressecação         | -   | -                                 | fúrcula                          | -                          | bowenóide            | +<br>(ep. atípico)                  | pêlos                | -                             | -                                  | +++ NIV III<br>WS e 16/18                                  | + NIV III |
| 4              | 65           | b     | biópsia            | -   | verrucosa                         | -                                | -                          | bowenóide            | +++<br>(condiloma)                  | -                    | condiloma acuminado           | + NIV III<br>+++ condiloma<br>(++) | WS-NIV III/condiloma<br>* 6/11- condiloma<br>* 16/18VINIII | -         |
| 5              | 34           | pt    | ressecação         | - condiloma colo;<br>-NIVA II+ condil.<br>- HIV + | hipocrômica                       | grande lábio D                   | U                          | bowenóide            | ++<br>(ep. atípico)                 | -                    | -                             | -                                  | +++ NIV III<br>WS e 16/18                                  | -         |
| 6              | 36           | b     | vulvotomia parcial | -   | -                                 | pequenos lábios D e E; clitoris  | M                          | bowenóide            | +<br>(ep. atípico)                  | pêlos                | -                             | -                                  | -  | + NIV III |
| 7              | 32           | b     | biópsia            | -   | -                                 | -                                | -                          | bowenóide            | +<br>(ep. atípico)                  | -                    | -                             | -                                  | ++ NIV III<br>WS e 16/18                                   | -         |
| 8              | 75           | pt    | ressecação         | -   | verrucosa e hipocrômica<br>2x1 cm | -                                | -                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma) | -                    | condiloma acuminado           | + condiloma                        | (++)<br>WS e 6/11<br>+VINIII e +++ condiloma               | -         |
| 9              | -            | b     | biópsia            | NIVA III + condiloma                              | -                                 | -                                | -                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico)                | -                    | condiloma acuminado no NIVIII | -                                  | -  | -         |

(continua)

I. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III (NIV III) (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material           | Doença TGF associada | Aspecto macroscópico                       | Localização das lesões                        | Lesões únicas ou múltiplas | Variante histológica | Colocitose                             | Extensão p/ra anexos | Epitélio adjacente  | IHQ HPV                         | HIS e tipo de HPV   | IHQ p53   |
|----------------|--------------|-------|--------------------|----------------------|--|---|----------------------------|----------------------|--|----------------------|---|---------------------------------|---|-----------|
| 10             | 42           | b     | ressecção          | ~                    | - hipocrômica;<br>- Collins +              | grande lábio E; fúrcula;<br>sulco interglúteo | M                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma)    | pêlos                | condiloma plano   | + NIV III                       | + VINIII<br>WS e 16/18  | + NIV III |
| 11             | 32           | ~     | ressecção          | ~                    | ~  | períneo                                       | ~                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma)    | ~                    | - condiloma acuminado no NIV III<br>- condiloma acuminado | + NIV III<br>++ condil.<br>(++) | ++<br>WS e 16/18<br>(- condiloma e ++ NIV III)                    | -         |
| 12             | 27           | b     | biópsia            | ~                    | ~  | ~   | ~                          | bowenóide            | + ep. atípico<br>+++ condiloma<br>(++) | ~                    | condiloma plano   | -                               | ++<br>WS e 16/18<br>NIV III e condiloma                           | + NIV III |
| 13             | 28           | pt    | biópsia            | ~                    | ~  | fúrcula                                       | ~                          | bowenóide            | -                                      | ~                    | hiperplasia escamosa                                      | -                               | -   | -         |
| 14             | 39           | b     | vulvotomia parcial | ~                    | pápulas hiper-hipocrômicas rugosas; 2,5 cm | pequenos lábios D e E;<br>fúrcula             | M                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma)    | pêlos                | condiloma plano   | -                               | -   | -         |
| 15             | 29           | b     | biópsia            | HIV +                | Collins +                                  | fúrcula                                       | ~                          | basalóide            | -                                      | ~                    | ~   | -                               | -   | -         |
| 16             | 61           | b     | biópsia            | ~                    | Collins +                                  | 9 e 12 horas                                  | M                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma)    | ~                    | - condiloma acuminado                                     | -                               | -   | -         |
| 17             | 32           | pt    | ressecção          | ~                    | hipocrômica                                | ~   | ~                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma)    | ~                    | condiloma acuminado                                       | + condiloma                     | (+++)<br>WS e 6/11 +++-;<br>NIV III e condiloma 16/18 +-; NIV III | -         |
| 18             | 45           | pt    | ressecção          | NIC II+ condiloma    | ~  | vulva à E                                     | ~                          | bowenóide            | ++<br>(ep. atípico e de condiloma)     | ~                    | condiloma plano   | -                               | -   | -         |
| 19             | 80           | b     | biópsia            | ~                    | hiperceratótica 0,4 cm                     | vulva à D                                     | ~                          | bowenóide            | -                                      | ~                    | -   | -                               | -   | -         |

(continua)

1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III (NIV III) (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material            | Doença TGF associada                                       | Aspecto macroscópico das lesões                          | Localização das lesões                             | Lesões únicas ou múltiplas | Variante histológica | Colocostose                         | Extensão para anexos | Epitélio adjacente  | IHQ HPV                              | HIS e tipo de HPV   | IHQ p63               |
|----------------|--------------|-------|---------------------|--|--|--|----------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|---|-----------------------|
| 20             | 70           | b     | biópsia             | carcinoma de colo  | ~  | pequeno lábio                                      | ~                          | bowenóide            | ++<br>(ep. atípico e de condiloma)  | -                    | condiloma plano     | -                                    | ++ 16/18 NIV III  | + NIV III             |
| 21             | 49           | b     | biópsia             | NIC III+ condiloma   | ~  | pequenos e grandes lábios D e E; fúrcula; perianal | M                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma) | pêlos                | condiloma plano     | ++ NIV III                           | (++) NIV III;<br>++ 16/18 e<br>+ 31/35/51                                 | -                     |
| 22             | 35           | pd    | biópsia             | ~  | hipercrômica   | grande lábio                                       | ~                          | bowenóide            | -                                   | -                    | -                   | + NIV III                            | -   | -                     |
| 23             | 26           | pd    | ressecação          | ~  | pápulas hipocrômica                                      | pequeno lábio D                                    | ~                          | bowenóide            | +<br>(ep. atípico)                  | -                    | -                   | + NIV III                            | -   | -                     |
| 24             | 43           | ~     | biópsia             | - condiloma no colo;<br>- tricomontase;<br>- VDRL +        | pápula hipocrômica em grande lábio E (1,5cm) e D (0,5cm) | grandes lábios D e E                               | M                          | bowenóide            | ++<br>(ep. atípico)                 | ~                    | ~                   | + NIV III                            | -   | -                     |
| 25             | 50           | b     | biópsia             | Doença de Bowen há 20 anos                                 | lesões nodulares hipohipercrômicas                       | períneo  | M                          | bowenóide            | +<br>(ep. atípico)                  | pêlos                | -                   | -                                    | -   | + NIV III             |
| 26             | 18           | b     | biópsia             | - CO III e condiloma -condiloma/ molusco contagioso vulvar | pápula hipercrômica                                      | grande lábio D                                     | ~                          | bowenóide            | -                                   | -                    | -                   | + NIV III                            | +++ 16/18 NIV III   | -                     |
| 27             | 17           | ~     | biópsia             | ~  | verrucosas   | ~  | ~                          | bowenóide            | +++<br>(ep. atípico e de condiloma) | -                    | condiloma acuminado | (+++)<br>+++ condiloma<br>++ NIV III | (+++)<br>+++ condiloma<br>+ NIV III;<br>16/18: + condiloma<br>+++ NIV III | + NIV III e condiloma |
| 28             | 78           | b     | vulvectomia simples | ~  | plana, irregular, hiperhipocrômica                       | grande e pequeno lábio D grande lábio E            | M                          | bowenóide            | ++<br>(ep. atípico e de condiloma)  | ~                    | condiloma plano     | -                                    | -   | -                     |
| 29             | 67           | b     | vulvectomia parcial | NIV II + condiloma   | hipocrômica  | fúrcula à D  | U                          | bowenóide            | -                                   | -                    | -                   | -                                    | -   | -                     |
| 30             | 60           | b     | ressecação          | - carcinoma de colo - NIVA III                             | ~  | pequenos lábios D e E                              | M                          | bowenóide            | ++<br>(ep. atípico)                 | ~                    | -                   | -                                    | -   | -                     |
| 31             | 44           | ~     | biópsia             | tumor de vulva recidivante                                 | ~  | pequeno lábio D; fúrcula                           | M                          | basalóide            | -                                   | ~                    | -                   | -                                    | + 16/18 NIV III   | -                     |

(continua)

1. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL VULVAR GRAU III (NIV III) (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material            | Doença TGF inferior associada            | Aspecto macroscópico das lesões                    | Localização das lesões                    | Lesões únicas ou múltiplas | Variante histológica | Colocitose | Extensão para anexos       | Epitélio adjacente   | IHQ HPV   | HIS e tipo de HPV | IHQ p63   |
|----------------|--------------|-------|---------------------|--|--|---|----------------------------|----------------------|------------|----------------------------|----------------------|-----------|-------------------|-----------|
| 32             | 82           | ~     | biópsia             | ~  | discrômica   | ~   | ~                          | bowenóide            | +          | -                          | -                    | + NIV III | -                 | + NIV III |
| 33             | 52           | b     | biópsia             | carcinoma de colo                        | hipercrômica, vegetante, 2,5cm                     | ~   | U                          | bowenóide            | +          | -                          | -                    | + NIV III | -                 | -         |
| 34             | 33           | b     | biópsia             | ~  | pápulas discrômicas                                | ~   | ~                          | bowenóide            | -          | pêlos e glândulas sebáceas | hiperplasia escamosa | -         | + 16/18 NIV III   | -         |
| 35             | 71           | b     | vulvectomia simples | ~  | erosão superficial acastanhada, 1cm grande lábio E | clitoris; pequenos e grandes lábios D e E | M                          | bowenóide            | ++         | pêlos e glândulas mucosas  | condiloma plano      | -         | -                 | -         |
| 36             | 15           | ~     | biópsia             | CO III e gestante                        | ~  | fúrcula                                   | U                          | bowenóide            | +++        | ~                          | condiloma plano      | -         | ++ 16/18 NIV III  | -         |
| 37             | 73           | b     | biópsia             | carcinoma de colo e 1/3 distal da vagina | ~  | grande lábio D                            | U                          | bowenóide            | ++         | glândulas sebáceas         | -                    | -         | -                 | -         |
| 38             | 82           | b     | ressecção           | ~  | pápula hipocrômica                                 | pequeno lábio E e fúrcula                 | M                          | bowenóide            | +          | -                          | colocitose leve      | -         | -                 | -         |

TGF - doença do trato genital feminino inferior

IHQ - imuno-histoquímica HIS - hibridização molecular *in situ*

HPV - papilomavirus humanos

Etnia - (b): branca; (pd): parda; (pt): preta

(-) - item não possível de ser avaliado

(-) - resultado negativo

Positividade - (+): grau leve; (++) : grau moderado; (+++) : grau intenso

Focalidade - U: unifocal; M: multifocal

Ep. - epitélio

Localização - D: direito; E: esquerdo

NIV II e NIV III - neoplasia intraepitelial vulvar grau II e III, respectivamente

NIC III - neoplasia intraepitelial cervical grau III

NIVA II e NIVA III - neoplasia intraepitelial vaginal grau II e III, respectivamente

HIV - vírus da imunodeficiência adquirida

VDRL - teste sorológico para sífilis

\* seguimento durante três anos com realização de biópsias, indicando persistência de lesões de NIV III sem progressão das lesões.

## 2. CARCINOMA ESCAMOSO SUPERFICIALMENTE INVASIVO DA VULVA (CA.SI)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material                                | Doença TGF associada             | Aspecto macroscópico das lesões             | Localização das lesões                    | Lesões únicas ou múltiplas* | Variante histológica e profundidade de invasão | Colocicose                      | Extensão para anexos       | Epitélio adjacente                      | Gânglios positivos | IHQ HPV   | HIS e tipo de HPV              | IHQ p53        |
|----------------|--------------|-------|---|----------------------------------|---|---|-----------------------------|--|---------------------------------|----------------------------|---|--------------------|-----------|--------------------------------|----------------|
| 39             | 68           | ~     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | carcinoma de vagina              | ~   | períneo                                   | M                           | bowenóide 0,23 mm                              | ++ (ep.atípico)                 | pêlos                      | NIV III bowenóide                       | -                  | -         | -                              | ++ SI          |
| 40             | 40           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | - carcinoma colo - D. de Whipple | hipercrômicas e ulceradas                   | pequenos e grandes lábios D/E ; clitoris, | M                           | bowenóide 0,23 mm                              | ++ (ep.atípico)                 | glândulas mucosas          | NIV III bowenóide                       | -                  | + NIV III | (+) VINIII + 16/18 ++ 31/35/51 | -              |
| 41             | 88           | b     | biópsia                                 | ~                                | exofítica e ulcerada                        | ~   | U                           | bowenóide 0,10 mm                              | + (ep.atípico)                  | ~                          | NIV III bowenóide                       | ~                  | -         | -                              | + SI           |
| 42             | 71           | b     | vulvectomia parcial + linf. ing. bilat. | ~                                | esbranquiçada, verrucosa, 3x2 cm            | grande lábio D                            | U                           | bowenóide 0,60 mm                              | + (ep.atípico)                  | pêlos e glândulas sebáceas | NIV III bowenóide                       | -                  | -         | -                              | -              |
| 43             | 47           | b     | vulvectomia parcial                     | NIC III/ condiloma               | pápulas hipocrômicas                        | pequeno e grande lábio D                  | M                           | bowenóide 0,47 mm                              | + (ep.atípico)                  | pêlos e glândulas sebáceas | NIV III bowenóide                       | ~                  | + NIV III | -                              | + NIV III      |
| 44             | 53           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | ~                                | áreas planas e irregulares                  | pequeno lábio D                           | U                           | queratinizante grau I 0,76 mm                  | + (ep.atípico)                  | -                          | -                                       | -                  | -         | -                              | -              |
| 45             | 37           | pd    | resseção                                | cervicite inespecífica           | brancamenta verrucosa, 2x1,5 cm             | fúrcula                                   | M                           | bowenóide 0,10 mm                              | ++ (ep. atípico e de condiloma) | -                          | NIV III bowenóide e condiloma plano     | ~                  | -         | -                              | ++ NIV III     |
| 46**           | 51           | b     | vulvectomia parcial + linf. ing. bilat. | NIC III                          | duas lesões verrucosas de 1,5 e 2,0 cm cada | períneo                                   | M                           | bowenóide 0,83 mm                              | +++ (ep.atípico)                | pêlos                      | condiloma acuminado e NIV III bowenóide | -                  | + NIV III | ++ VINIII WS e 16/18           | + SI e NIV III |
| 47             | 66           | b     | biópsia                                 | carcinoma de colo                | ~   | períneo                                   | U                           | bowenóide 0,90 mm                              | + (ep.atípico)                  | ~                          | NIV III bowenóide                       | ~                  | -         | -                              | + SI           |

Etnia - b: branca; pd: parda; pt: preta  
 Focalidade - U: unifocal; M: multifocal  
 NIV III - neoplasia intraepitelial vulvar grau III  
 IHQ - imunohistoquímica  
 (-) - item não possível de ser avaliado  
 Ca SI - carcinoma superficialmente invasivo

TGF - doença do trato genital feminino inferior  
 Localização - D: direito; E: esquerdo  
 NIC III - neoplasia intraepitelial cervical grau III  
 HPV - papilomavírus humanos  
 Positividade - (+): grau leve; (++) : grau moderado; (+++) : grau intenso

Profundidade de invasão - medido a partir da junção dermo-epidérmica da papila dérmica mais superficial adjacente ao tumor, até o ponto mais profundo da invasão tumoral.

\* a multifocalidade das lesões foi considerada em relação às alterações de NIV III no epitélio, pois a presença de múltiplos focos de carcinoma superficialmente invasivo separados por epitélio normal, não é mais considerado como Superficialmente Invasivo pela Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD).

\*\* paciente submetida a vulvectomia simples há 12 anos por NIV III padrão basaloide, em pequenos lábios D e E, com atípicas colicíticas discretas no epitélio atípico, e extensão para anexos cutâneos. As técnicas de IHQ e HIS foram negativas. Sem controle desde então, retornando após 12 anos.

Linf. ing. bilat. - linfadenectomia inguinal bilateral  
 Ep. - epitélio  
 CO III - citologia cérvico-vaginal classe III (Papanicolaou)

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material                                | Doença TGF associada | Aspecto macroscópico das lesões                     | Localização das lesões                    | Lesões multi-ou unifocais | Variante histológica e profundidade de Invasão | Coloicoiose | Alteração epitelial adjacente   | Gânglios positivos  | IHQ HPV | HIS e tipo de HPV | IHQ p63             |
|----------------|--------------|-------|---|----------------------|---|---|---------------------------|--|-------------|---|---------------------|---------|-------------------|---------------------|
| 48             | 69           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | exofítica, ulcerada, 3,5x3,3 cm                     | pequeno lábio D                           | U                         | queratinizante grau II, 15 mm                  | +           | distrofia mista   | + 3/9 D<br>0/4 E    | -       | -                 | ++<br>invasão       |
| 49*            | 51           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | nódulo esbranquiçado 2x1 cm                         | grandes lábios D e E, pequeno lábio E     | M                         | queratinizante grau I, 4mm                     | -           | D - hiperplasia escamosa<br>E - NIV III bowenóide + carcinoma SI (1mm)  | -                   | -       | -                 | +++<br>invasão e SI |
| 50*            | 63           | b     | vulvectomia parcial + linf. ing. bilat. | -                    | ulcerada e exofítica 1,5x1 cm                       | grandes lábios D e E perineo              | M                         | queratinizante grau II, 4mm                    | -           | - grandes lábios D e E com carcinoma SI (1mm)<br>- hiperplasia escamosa | + 1/11 E<br>+ 1/9 D | -       | -                 | ++ SI               |
| 51             | 76           | b     | ressecção + linf. ing. bilat.           | -                    | esbranquiçada, centro deprimido, elevada, 2x2x0,5cm | grande lábio D                            | U                         | queratinizante grau I, 3 mm                    | -           | hiperplasia escamosa  | -                   | -       | -                 | ++<br>invasão       |
| 52             | 41           | b     | ressecção + linf. ing. bilat.           | -                    | nódulo 2x2 cm castanho-acinzentado                  | grande lábio E                            | U                         | condilomatoso grau I, 5 mm                     | +           | - hiperplasia escamosa;<br>- NIV I com coloicoiose leve                 | -                   | -       | -                 | ++<br>invasão       |
| 53             | 64           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | exofítica, ulcerada, brancacenta, 4,5x3cm           | pequeno e grande lábio E, e clitoris      | U                         | queratinizante grau II, 5 mm                   | -           | liquen escleroso  | + 1/8 E<br>0/6 D    | -       | -                 | ++<br>invasão       |
| 54             | 86           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | exofítica, esbranquiçada                            | pequenos e grandes lábios D/E e clitoris  | M                         | condilomatoso grau I, 10 mm                    | +           | distrofia mista   | + 2/9 D<br>0/8 E    | -       | -                 | ++<br>invasão       |
| 55             | 77           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | ulceração rasa                                      | pequeno e grande lábio D                  | U                         | queratinizante grau II, 2,3 mm                 | -           | distrofia mista e NIV I   | -                   | -       | -                 | +<br>invasão        |
| 56             | 74           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | exofítica, ulcerada 2x2 cm                          | pequeno lábio E e clitoris                | U                         | queratinizante grau II, 2,25 mm                | +++         | NIV III bowenóide e condiloma plano                                     | -                   | -       | -                 | +++<br>invasão      |
| 57             | 72           | b     | vulvectomia simples                     | -                    | área Irregular/nódula                               | pequeno lábio E                           | U                         | queratinizante grau I, 1,77 mm                 | -           | distrofia mista   | -                   | -       | -                 | -                   |
| 58             | 69           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | rugosa, acastanhada elevada, 1x1 cm                 | clitoris                                  | U                         | queratinizante grau II, 4 mm                   | -           | liquen simples crônico  | + 7/14 E<br>+ 3/5 D | -       | -                 | -                   |
| 59             | 70           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | exofítica, ulcerada 2x2,5 cm                        | pequenos e grandes lábios D e E, clitoris | M                         | queratinizante grau II, 4,5 mm                 | -           | distrofia mista e NIV I   | -                   | -       | -                 | +++<br>invasão      |
| 60             | 78           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat. | -                    | exofítica, volumoso 6,5x5 cm                        | pequenos e grandes lábios D e E, clitoris | U                         | queratinizante grau II, 12 mm                  | +           | - NIV II<br>- liquen simples crônico                                    | + 1/6 E<br>+ 1/6 D  | -       | -                 | -                   |

(continua)

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material   | Doença TGF associada | Aspecto macroscópico das lesões                     | Localização das lesões                                | Lesões multi-ou unifocais | Variante histológica e profundidade de invasão | Colocitose                   | Alteração epitelial adjacente                       | Gânglios positivos               | IHQ HPV | HIS e tipo de HPV | IHQ p63                                  |
|----------------|--------------|-------|--|----------------------|---|---|---------------------------|--|------------------------------|---|----------------------------------|---------|-------------------|--|
| 61             | 70           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. ing. bilat.           | ~                    | exofítica, esbranquiçada,<br>ulcerada, 3x2,5x0,8 cm | pequeno e grande<br>lábio D                           | U                         | queratinizante<br>grau II, 4 mm                | -                            | hiperplasia escamosa                                | -                                | -       | -                 | -  |
| 62             | 77           | b     | vulvectomia simples                                  | ~                    | exofítica, 1,5x1,5 cm                               | pequeno lábio E                                       | U                         | queratinizante<br>grau I, 4,2 mm               | +<br>células do tumor        | distrofia mista e NIV I                             | ~                                | -       | -                 | ++ invasão<br>+ NIV /hiperplasia<br>(++) |
| 63             | 65           | b     | vulvectomia simples                                  | ~                    | exofítica, 3,0x1,5 cm                               | clitoris, pequeno e<br>grande lábio E                 | U                         | queratinizante<br>grau I, 13 mm                | +<br>células do tumor        | distrofia mista                                     | ~                                | -       | -                 | -  |
| 64*            | 67           | b     | vulvectomia radical<br>+ linf. ing. bilat.           | ~                    | nódulos esbranquiçados e<br>ulcerados, 1,5x1,0 cm   | pequeno lábio D e<br>região inguinal E                | M                         | queratinizante<br>grau I, 15 mm                | +<br>NIV III                 | - NIV III basalóide,<br>- hiperplasia escamosa      | -                                | -       | -                 | ++<br>invasão                            |
| 65             | 71           | b     | vulvectomia radical<br>+ linf. ing. bilat.           | ~                    | exofítico, esbranquiçado,<br>2,5x1,5x1,5 cm         | pequeno e grande<br>lábio D                           | U                         | queratinizante<br>grau I, 7 mm                 | +<br>células do tumor        | distrofia mista                                     | -                                | -       | -                 | ++<br>invasão                            |
| 66             | 73           | b     | vulvectomia simples +<br>linf. ing. bilat. + Cloquet | ~                    | exofítico, ulcerado,<br>5x3,5 cm                    | pequeno e grande<br>lábio D, e clitoris               | U                         | queratinizante<br>grau II, 10 mm               | -                            | -   | +1/2 E<br>+2/10 D<br>0 - Cloquet | -       | -                 | -  |
| 67             | 70           | b     | vulvectomia radical<br>+ linf. ing. bilat.           | ~                    | tumor de 3x3 cm                                     | pequeno lábio D                                       | U                         | queratinizante<br>grau II, 3 mm                | -                            | hiperplasia escamosa                                | -                                | -       | -                 | -  |
| 68*            | 61           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. ing. bilat. + Cloquet | ~                    | exofítica, ulcerada,<br>1,5x1x0,4 cm                | clitoris  | U                         | queratinizante<br>grau II, 6 mm                | +<br>NIV I                   | - hiperplasia escamosa<br>- NIV I e colicilose leve | +3/9 E<br>0/6 D e Cloquet        | -       | -                 | -  |
| 69             | 86           | pd    | vulvectomia simples                                  | ~                    | exofítica, 4,5x4,5x0,7 cm                           | pequeno e grande<br>lábio D                           | U                         | queratinizante<br>grau I, 6 mm                 | -                            | distrofia mista                                     | ~                                | -       | -                 | +++<br>invasão                           |
| 70             | 60           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. inguino-crural bilat. | ~                    | exofítica, verrucosa,<br>5x5x4 cm                   | pequenos e grandes<br>lábios D/E,<br>clitoris, uretra | U                         | queratinizante<br>grau II, 10 mm               | +<br>células do tumor        | - NIV III basalóide<br>- liquen escleroso           | +2/14 D<br>+2/9 E                | -       | -                 | +<br>invasão                             |
| 71             | 58           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. inguino-crural bilat. | ~                    | exofítica, 4x3,5 cm                                 | pequeno lábio E                                       | U                         | queratinizante<br>grau I, 9 mm                 | +<br>NIV I e NIV III         | - NIV III basalóide<br>- NIV I                      | -                                | -       | -                 | ++<br>invasão, NIV I e III               |
| 72             | 58           | pt    | vulvectomia radical +<br>linf. inguino-crural bilat. | ~                    | exofítica, volumosa,<br>ulcerada, 6x6x2 cm          | pequenos e grandes<br>lábios D e E, clitoris          | U                         | basalóide<br>15 mm                             | -                            | NIV III basalóide                                   | + 1/6 D<br>0/10 E                | -       | -                 | -  |
| 73             | 79           | b     | vulvectomia simples +<br>linf. inguino-crural bilat. | ~                    | exofítica, ulcerada,<br>7x5x1,5 cm                  | pequeno e grande<br>lábio D e clitoris                | U                         | queratinizante<br>grau I, 9 mm                 | ++ ep.normal,<br>NIV I e III | - NIV I e NIV III basalóide<br>- distrofia mista    | +1/10 D<br>+1/9 E                | -       | -                 | +++<br>invasão e NIV III                 |

(continua)

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material  | Doença TGF associada | Aspecto macroscópico das lesões               | Localização das lesões                                    | Lesões multi-ou unifocais | Variante histológica e profundidade de invasão | Colocitose                             | Ateração epitelial adjacente                                  | Gânglios positivos   | IHQ HPV | HIS e tipo de HPV                        | IHQ p53                      |
|----------------|--------------|-------|---|----------------------|---|---|---------------------------|--|--|---|----------------------|---------|--|------------------------------|
| 74             | 47           | pd    | vulvectomia radical +<br>linf. inguino-crural bilat.<br>+ amputação reto/ânus | ~                    | vegetante, esbranquiçada,<br>frível, 4x2x1 cm | períneo   | U                         | basalóide<br>12 mm                             | ++<br>NIV III e<br>condiloma           | -<br>condiloma plano<br>- NIV III basabóide e<br>bowenóide    | + 2/17 D<br>0/14 E   | -       | ++<br>WS e 16/18<br>NIV III<br>bowenóide | -                            |
| 75             | 66           | b     | vulvectomia simples +<br>linf. inguino-crural bilat.                          | ~                    | exofítica, 5x4x2,5 cm                         | pequenos lábios D/E,<br>clitoris                          | U                         | queratinizante<br>grau II, 6 mm                | -                                      | hiperplasia escamosa  | + 1/15 D<br>+ 2/20 E | -       | -  | +<br>hiperplasia<br>escamosa |
| 76             | 78           | b     | vulvectomia simples   | ~                    | exofítica, esbranquiçada,<br>3,5x2x1 e 1x1 cm | pequeno e grande<br>lábio E, grande lábio<br>D e clitoris | M                         | queratinizante<br>grau I, 9 mm                 | -                                      | hiperplasia escamosa<br>- NIV III basabóide<br>- carcinoma SI | ~                    | -       | -  | -                            |
| 77             | 78           | b     | vulvectomia simples   | ~                    | elevada, irregular 2x1 cm                     | pequeno lábio D   | U                         | queratinizante<br>grau II, 2 mm                | +                                      | - NIV II e III basabóide<br>- liquen escleroso                | ~                    | -       | -  | -                            |
| 78             | 81           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. ing. bilat. + ilíaca<br>ext. D                 | ~                    | plana, ulcerada, 2,5x1,5 cm                   | pequeno lábio D e<br>clitoris                             | U                         | queratinizante<br>grau I, 2,3 mm               | -                                      | liquen escleroso  | +                    | -       | -  | -                            |
| 79             | 77           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. ing. bilat.                                    | NIVA III             | elevadas, ulceradas<br>2x1,5 cm               | pequenos lábios D/E                                       | M                         | queratinizante<br>grau I, 4 mm                 | -                                      | hiperplasia escamosa  | -                    | -       | -  | -                            |
| 80             | 71           | b     | vulvectomia radical<br>+ linf. ing. bilat.                                    | ~                    | tumor extenso, ulcerado<br>4x2 cm             | pequeno lábio D   | U                         | queratinizante<br>grau II, 6 mm                | +                                      | -   | + 3/12 D<br>0/6 E    | -       | -  | ++<br>Invasão                |
| 81             | 64           | b     | vulvectomia simples   | ~                    | discromia                                     | pequeno lábio D   | U                         | queratinizante<br>grau II, 1,5 mm              | -                                      | vulvite crônica   | ~                    | -       | -  | -                            |
| 82             | 62           | b     | vulvectomia radical<br>+ linf. ing. bilat.                                    | ~                    | exofítica, verrucosa<br>5,5x5 cm              | clitoris  | U                         | condilomatoso<br>grau I, 7 mm                  | ++                                     | liquen escleroso  | + 2/17 E<br>0/18 D   | -       | -  | +<br>invasão                 |
| 83             | 49           | b     | vulvectomia radical +<br>linf. inguino-crural bilat.                          | ~                    | exofítico, ulcerado,<br>3,5x3,5 cm            | clitoris  | U                         | queratinizante<br>grau II, 8 mm                | +                                      | hiperplasia escamosa<br>- NIV I e coloitose leve              | -                    | -       | -  | ++<br>invasão                |
| 84*            | 34           | b     | vulvectomia radical<br>+ linf. ing. bilat.                                    | ~                    | exofíticas, ulceradas<br>2,5x2,5 cm e 1x1 cm  | pequeno lábio E e<br>clitoris                             | M                         | queratinizante<br>grau I, 5 mm                 | (+)<br>+ células tumor<br>++ na uretra | hiperplasia escamosa<br>-condiloma plano (uretra)             | + 1/7 D<br>+ 6/12 E  | -       | -  | ++<br>invasão                |

(continua)

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material  | Doença TGF associada | Aspecto macroscópico das lesões     | Localização das lesões   | Lesões multifocais ou unifocais | Variante histológica e profundidade de invasão | Colocicose  | Alteração epitelial adjacente                                   | Gânglios positivos          | IHQ HPV      | HIS e tipo de HPV   | IHQ p63                         |
|----------------|--------------|-------|---|----------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------|--|---|---|-----------------------------|--------------|---------------------|---------------------------------|
| 85*            | 56           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat.               | ~                    | exofítico, ulcerado, extenso 7x4 cm | pequenos e grandes lábios E e D, clitoris e 1/3 proximal da vagina | U                               | queratinizante grau II, 8 mm                   | +   | hiperplasia escamosa  | + 1/11 D<br>+ E coalescidos | -            | -                   | ++<br>invasão                   |
| 86*            | 45           | b     | vulvectomia simples                                   | carcinoma do colo    | pápulas esbranquiçadas              | pequenos lábios E/D  | M                               | basalóide 1,8 mm                               | ++ NIV III  | NIV III bowenóide   | ~                           | +<br>NIV III | -                   | +<br>NIV III                    |
| 87             | 74           | b     | vulvectomia radical + linf. inguino-crural bilat.     | ~                    | exofítico, ulcerado, 4x2,5x1 cm     | pequeno e grande lábio D   | U                               | basalóide 3,9 mm                               | (++)<br>+ células do tumor<br>++ NIV III            | NIV III bowenóide e basalóide                                   | -                           | -            | -                   | (++)<br>++ invasão<br>+ NIV III |
| 88*            | 76           | b     | vulvectomia superficial + amputação abdomino-perineal | ~                    | exofítico, ulcerado, 6x5x1,5 cm     | períneo  | U                               | queratinizante grau II, 6 mm                   | +   | -   | ~                           | -            | -                   | ++<br>invasão                   |
| 89             | 63           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat.               | -                    | exofíticos 4x2,5x0,5 e 2,5x1x1 cm   | pequeno e grande lábio D, pequeno lábio E, inguinal D              | M                               | basalóide 10 mm                                | (++)<br>++NIV III e ep.normal<br>+ células do tumor | NIV III basalóide   | + 6/12 D<br>+ 5/8 E         | -            | -                   | -                               |
| 90             | 63           | b     | vulvectomia radical + linf. inguino-crural bilat.     | ~                    | pápula acastanhada 0,5 cm           | pequeno lábio E  | U                               | queratinizante grau I, 1,77 mm                 | -   | - carcinoma SI (1 mm)<br>- liquen escleroso                     | -                           | -            | -                   | -                               |
| 91             | 76           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat.               | ~                    | nódulo 1 cm pardo-esbranquiçado     | fúrcula à E  | U                               | queratinizante grau II, 5 mm                   | +   | - hiperplasia escamosa com atipia (NIV I)<br>- liquen escleroso | + 2/6 E<br>0/9 D            | -            | -                   | ++<br>invasão                   |
| 92**           | 38           | pd    | biópsia   | NIVA II              | dis cromica, Collins +              | grande lábio D   | U                               | queratinizante grau II, 2 mm                   | ++<br>NIV III e condiloma                           | - NIV III bowenóide<br>- condiloma plano                        | ~                           | + NIV III    | ++ 16/18<br>NIV III | -                               |
| 93             | 66           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat.               | ~                    | esbranquiçada, ulcerada, 0,5x0,2 cm | fúrcula à E  | U                               | queratinizante grau I, 1,5 mm                  | -   | hiperplasia escamosa  | + 15/19 D<br>+ 13/18 E      | -            | -                   | -                               |
| 94             | 78           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat.               | ~                    | exofítica, verrucosa                | pequeno lábio D  | U                               | verrucoso 10 mm                                | +   | liquen escleroso  | -                           | -            | -                   | -                               |
| 95             | 80           | b     | vulvectomia simples                                   | ~                    | exofítica, verrucosa, extensa       | pequenos e grandes lábios D e E, clitoris                          | U                               | verrucoso 6 mm                                 | -   | -   | ~                           | -            | -                   | -                               |
| 96             | 71           | b     | vulvectomia radical + linf. ing. bilat.               | ~                    | esbranquiçada, ulcerada             | pequenos e grandes lábios D e E, clitoris                          | M                               | queratinizante grau II, 6 mm                   | -   | distrofia mista   | -                           | -            | -                   | -                               |

(continua)

### 3. CARCINOMA ESCAMOSO INVASIVO DA VULVA (CONTINUAÇÃO)

| Número do caso | Idade (anos) | Etnia | Material                               | Doença TGF associada | Aspecto macroscópico das lesões            | Localização das lesões     | Lesões multi- ou unifocais | Variante histológica e profundidade de invasão | Colocitose                     | Alteração epitelial adjacente             | Gânglios positivos   | IHQ HPV            | HIS e tipo de HPV | IHQ p63                  |
|----------------|--------------|-------|--|----------------------|--|----------------------------|----------------------------|--|--------------------------------|---|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|
| 97             | 59           | b     | vulvectomia radical + lmf. ing. bilat. | ~                    | esbranquiçada, exofítica, 2x1 cm           | pequenos lábios D/E        | M                          | queratinizante grau II, 11 mm                  | + células do tumor e NIV II    | hiperplasia escamosa com atipias (NIV II) | -                    | -                  | -                 | +<br>invasão e NIV II    |
| 98             | 75           | b     | vulvectomia radical + lmf. ing. bilat. | ~                    | vegetante, ulcerada, 4 cm                  | pequeno e grande lábio E   | U                          | condilomatoso grau II, 14 mm                   | ++ células do tumor e NIV II   | - hiperplasia escamosa - NIV II           | + 2/10 E<br>0/5 D    | -                  | -                 | +++<br>invasão           |
| 99             | 88           | b     | vulvectomia radical + lmf. ing. bilat. | ~                    | exofítica, ulcerada, 4x3 cm                | clitoris                   | U                          | queratinizante grau III, 7 mm                  | -                              | Doença de Paget multifocal                | + 1/1 D<br>+ 1/1 E   | -                  | -                 | ++<br>invasão e D, Paget |
| 100            | 54           | b     | vulvectomia radical + lmf. ing. bilat. | carcinoma de colo    | exofíticas, ulceradas, 3x2x1,6 cm e 0,5 cm | pequenos lábios D/E        | M                          | basalóide, 10 mm                               | -                              | hiperplasia escamosa                      | + 1/1 D<br>+ 1/1 E   | + células do tumor | -                 | -                        |
| 101            | 77           | b     | vulvectomia radical + lmf. ing. bilat. | ~                    | exofítica, ulcerada, 6x5 cm                | pequeno lábio E e clitoris | U                          | queratinizante grau II, 5 mm                   | + células do tumor e ep normal | hiperplasia escamosa                      | + 4/14 E<br>+ 1/12 D | -                  | -                 | ++<br>invasão            |
| 102            | 76           | b     | vulvectomia radical + lmf. ing. bilat. | ~                    | exofítica, ulcerada 4x3x1 cm               | pequeno lábio D            | U                          | queratinizante grau I, 12 mm                   | -                              | distrofia mista                           | -                    | -                  | -                 | ++<br>invasão            |

**Etnis-** b: branca; pd: parda; pt: preta

**TGF** - doença do trato genital feminino inferior

**NIV I, II, III** - neoplasia intraepitelial vulvar grau I, II, e III, respectivamente

**NIVA II, III** - neoplasia intraepitelial vaginal grau II, e III, respectivamente

**Ext. D.** - externa direita

**Ext. E.** - esquerda

**Localização - D;** direito; **E;** esquerdo

**IHQ** - imunohistoquímica

**HPV** - papilomavírus humanos

**Focalidade - U;** unifocal; **M;** multifocal

**HIS** - hibridização molecular *in situ*

**Positividade - (+)** : grau leve, **(++)** : grau moderado, **(+++)** : grau intenso

**(-)** - resultado negativo

**Profundidade de invasão** - medido a partir da junção dermo-epidérmica da papila dérmica mais superficial adjacente ao tumor até o ponto mais profundo da invasão tumoral. Quando não possível, foi medida a espessura do tumor.

**SI** - superficialmente invasivo

\* pacientes apresentando recidivas da neoplasia:

- caso 49: submetida a vulvectomia radical e linfadenectomia há sete anos, por carcinoma escamoso invasivo vulvar grau I.

- caso 50: apresentou mais duas recidivas no mesmo ano da realização da vulvectomia parcial e linfadenectomia.

- caso 64: recidiva após um ano da vulvectomia radical com linfadenectomia.

- caso 68 e 65: recidiva no mesmo ano da realização da vulvectomia e linfadenectomia.

- caso 84: recidiva no mesmo ano da realização de ressecção de lesão por diagnóstico de carcinoma verrucoso.

- caso 86: paciente com biópsia com diagnóstico de NIV III bowenóide. Realizado vulvectomia simples, que evidenciou carcinoma invasivo basalóide. Retoma no mesmo ano com recidiva da neoplasia invasora.

- caso 88: submetida a vulvectomia radical e linfadenectomia há sete anos, por carcinoma escamoso invasivo vulvar grau II.

\*\* paciente com diagnóstico de NIV III bowenóide multifocal há cinco anos. Após esta data, em 1991, retorna com diagnóstico de carcinoma invasivo grau II com dois milímetros de profundidade de invasão. Realizado vulvectomia radical, a qual mostrou apenas NIV III bowenóide. Retorna após um ano, com duas novas biópsias, com diagnóstico de carcinoma microinvasivo (estádio Ia) e NIV III bowenóide, respectivamente.

## ANEXO II

---

### PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AS REAÇÕES

#### 1. SILANIZAÇÃO DAS LÂMINAS

- . lavar e enxaguar bem as lâminas com detergente comum;
- . mergulhar as lâminas em berço de aço inox, durante 20 minutos em solução de HCl 1M;
- . passar as lâminas em três cubas de água destilada, cinco mergulhos em cada;
- . passar em álcool absoluto;
- . mergulhar as lâminas durante 20 minutos em uma solução de álcool absoluto e ácido acético numa proporção de 3:1;
- . deixar secar ao ar;
- . mergulhar as lâminas em uma solução de organossilano (3-aminopropyltriethoxy-silane, Sigma, A-3648) a 2% em acetona, durante cinco minutos a temperatura ambiente;
- . passar em duas cubas de acetona pura, cinco banhos em cada;
- . passar em duas cubas de água destilada, dois banhos em cada;
- . secar ao ar;
- . embrulhar as lâminas em papel laminado e guardar em local escuro.

#### 2. HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU*

##### 2.1. Pepsina (Sigma, P-7012)

- . 0,08% de pepsina em HCl 0,2N (0,08 g de pepsina em 100 ml de HCl 0,2N)

##### 2.2. Solução estrigente (Dako, S3500)

- . diluição 1:50 : 2ml da solução estrigente do kit em 98 ml de água destilada deionizada estéril

##### 2.3. Tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,6; NaCl 0,3M; Tween 20 0,1%)

- . 100 ml Tris-HCl 0,5M e NaCl 3M, pH 7,6
- . 1 ml de Tween 20
- . completar para 1000 ml com água destilada

##### 2.4. Complexo estreptavidina-biotina (CSA System, Dako, K1500)

- . 1 ml do diluente (frasco 7)
- . 1 gota de estreptavidina em PBS (frasco 5)
- . 1 gota de biotina conjugada a peroxidase em PBS (frasco 6)

##### 2.5. Reagente cromógeno (DAB, Sigma, D-5637)

- . 60 mg de DAB (3,3'-tetrahydrocloro de diaminobenzidina)
- . 100 ml de tampão PBS
- . 500 µl de peróxido de hidrogênio 30%
- . 1 ml de DMSO (dimetil-sulfóxido, Synth, Brasil)

### 3. IMUNO-HISTOQUÍMICA

#### 3.1. Solução inibidora da peroxidase endógena

- . solução a 3% de peróxido de hidrogênio 30% em metanol (90 ml de álcool metílico e 10 ml de peróxido de hidrogênio 30%)

#### 3.2. Tampão citrato 0,01M

- . 36,8 ml de ácido cítrico 0,1M (19,21 g de ácido cítrico anidro em 1000 ml de água destilada)
- . 63,2 ml de fosfato dissódico 0,25M (35,60 g de fosfato dissódico anidro em 1000 ml de água destilada)
- . acertar o pH para 6,0 com HCl 1N

#### 3.3. Preparo do tampão BSA (Sigma, A-7888) para diluição do anticorpo primário

- 0,5 g de soro-albumina bovina em 10 ml de água destilada
  - 0,5 g de azida sódica em 10 ml de água destilada
- \* para o uso: 1,25 ml de I + 2,5 ml de II + 59 ml de tampão PBS concentrado

#### 3.4. Tampão salino-fosfato concentrado (PBS)

- . 14 g de fosfato de sódio dibásico
- . 4,3 g de fosfato de potássio monobásico
- . 72 g de cloreto de sódio
- . 1000 ml de água destilada

\* para o uso (lavagens), diluir dez vezes (100 ml do tampão concentrado em 900 ml de água destilada). Acertar o pH para 7,6 com HCl 1N

#### 3.5. Preparo do tampão PBS com azida (para diluição do anticorpo secundário)

- . 0,5 g de azida sódica em 100 ml do tampão PBS concentrado

#### 3.6. Complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (S-ABC, 1:100, Dako, K-377)

- . 10 µl do reagente A (estreptavidina)
- . 1000 µl de tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,6
- . 10 µl do reagente B (peroxidase biotinilada)

#### 3.7. Tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,6

- . Tris-HCl 1N: diluir 60,50 g de Tris-base em 300 ml de água destilada. Acertar o pH para 7,6 com HCl 1N, e então completar o volume para 500 ml
- . Tris-HCl 0,05N: diluir 5 ml de Tris-HCl 1N em 100 ml de água destilada

#### 3.8. Diaminobenzidina (DAB, Sigma, D-5637)

- . 40 mg de 3,3'-tetrahydrocloro de diaminobenzidina
- . 100 ml de tampão PBS diluído pH 7,6
- . 50 µl de peróxido de hidrogênio 30%

#### 3.9. Hematoxilina de Mayer

- . 1 g de hematoxilina
- . 0,2 g de iodato de sódio
- . 50 g de alúmen de amônio
- . 1 g de ácido cítrico
- . 50 g de hidrato de cloral
- . 1000 ml de água destilada

## ANEXO III

---

---

### PROCEDIMENTO DAS REAÇÕES

#### 1. HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR *IN SITU*

- **incubação das lâminas** silanizadas contendo cortes histológicos de cinco micrômetros em estufa a 110°C durante uma hora, para melhor adesão dos fragmentos;
- **desparafinação** dos cortes, com dois banhos de xilol, cinco minutos cada, à temperatura ambiente;
- **hidratação** em gradiente decrescente de álcoois: dois banhos em álcool absoluto, três banhos em álcool 95%, e uma vez em álcool 70%; dois minutos cada, todos à temperatura ambiente;
- **lavagem** em água destilada estéril;
- **digestão enzimática** com pepsina 0,08% (Pepsin, Sigma, P-7012). Incubação a 37°C durante dez minutos;
- **lavagem** em água destilada estéril, dois banhos, cinco minutos cada, sob agitação, à temperatura ambiente;
- **secagem** das lâminas;
- **aplicação** de 15 microlitros das sondas de HPV biotinizadas (Dako) sobre os cortes, e colocação de laminulas previamente desengorduradas;
- **incubação** das lâminas em estufa pré-aquecida a 90°C (85 a 95°C), durante seis minutos;
- **transferência** das lâminas para câmara úmida, e incubação em estufa a 37°C, durante a noite;
- **lavagem** das lâminas em solução estrigente (1:50, Dako, S3500), sob agitação leve, durante cinco minutos, à temperatura ambiente;
- **lavagem** com solução estrigente, durante dez minutos, em estufa a 37°C;
- **incubação** em tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M pH 7,6; NaCl 0,3M; Tween 20 0,1%), dois banhos, cinco minutos cada, sob agitação, à temperatura ambiente;
- **secagem** das lâminas ao ar;
- **incubação** das lâminas com 50 microlitros do complexo estreptavidina-biotina (CSA System, Dako, K1500), em câmara úmida coberta, durante 15 minutos, à temperatura ambiente;
- **incubação** em tampão de lavagem, três banhos, cinco minutos cada, sob agitação leve, à temperatura ambiente;
- **secagem** das lâminas;
- **incubação** das lâminas com 50 microlitros do reagente de amplificação (CSA System, Dako, K1500), em câmara úmida coberta, durante 15 minutos, à temperatura ambiente;
- **incubação** em tampão de lavagem, três banhos, cinco minutos cada, sob agitação leve, à temperatura ambiente;
- **secagem** das lâminas;

- **incubação** das lâminas com 50 microlitros de estreptavidina-peroxidase (CSA System, Dako, K1500), em câmara úmida coberta, durante 15 minutos, à temperatura ambiente;
- **incubação** em tampão de lavagem, três banhos, cinco minutos cada, sob agitação leve, à temperatura ambiente;
- **secagem** das lâminas;
- **coloração**, realizada com DAB (3,3'- tetrahydrocloroto de diaminobenzidina, Sigma, D-5637). Incubação por cerca de dois minutos, à temperatura ambiente, ou até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada;
- **contra-coloração** com hematoxilina de Mayer por um minuto;
- **lavagem** em água corrente e passagem em água amoniacal;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada;
- **desidratação** em gradiente crescente de álcoois;
- **passagem** em três xilóis;
- **montagem** das lâminas com lamínulas e Entellan (Merck, 7961).

## 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA

- **os cortes histológicos** de cinco micrômetros foram colocados em lâminas lavadas, desengorduradas e silanizadas, para melhor adesão dos fragmentos;
- **incubação das lâminas** com os cortes por cerca de 24 horas em estufa a 60°C, para melhor adesão dos mesmos;
- **desparafinação dos cortes**, com um banho de xilol a 60°C por 15 minutos, e dois banhos de xilol à temperatura ambiente, dez minutos cada;
- **hidratação** em gradiente decrescente de álcoois: três banhos em álcool absoluto, uma vez em álcool 80% e, um banho em álcool 50%; dois minutos cada, todos à temperatura ambiente;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada;
- **inibição da peroxidase endógena**: banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio 30% em metanol, 15 minutos, à temperatura ambiente;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada;
- **incubação das lâminas** em tampão citrato 0,01M pH 6.0, em forno de microondas (doméstico, Sharp). Para a detecção do antígeno viral, utilizou-se, dois ciclos de cinco minutos cada a 70°C. Para a proteína p53, três ciclos de sete minutos cada na potência máxima (750 W). Esfriar durante dez minutos;
- **reação antígeno-anticorpo primário**: incubação com o anticorpo primário, durante a noite a 4°C, em câmara úmida. Para o antígeno viral, utilizou-se anticorpo primário de coelho anti-papilomavírus (policlonal, diluição 1:150, Dako, B-580). Para a proteína p53, anticorpo primário de camundongo anti-proteína p53 humana (monoclonal, clone DO-7, diluição 1:100, Dako, M-7001);
- **retirada do excesso de anticorpo primário** com três lavagens em tampão PBS (tampão salino-fosfato, pH 7,6), cinco minutos cada, à temperatura ambiente;
- **incubação com anticorpo secundário biotilado** de suíno, anti-coelho-cabra-camundongo (policlonal, diluição 1:200, Kit Multilink, Dako, E-453), 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida;

- **retirada do excesso de anticorpo secundário** com três lavagens em tampão PBS (pH 7,6), cinco minutos cada, à temperatura ambiente;
- **reação com S-ABC**: incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (diluição 1:100, Dako, K-377), 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida;
- **retirada do excesso do complexo S-ABC** com três lavagens em tampão PBS (pH 7,6), cinco minutos cada, à temperatura ambiente;
- **coloração** (revelação do substrato-cromógeno): realizada com DAB (3,3'-tetrahydrocloroto de diaminobenzidina, Sigma, D-5637). As lâminas foram deixadas nesta solução por cerca de dois minutos à temperatura ambiente, ou até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada;
- **contra-coloração** da amostra com hematoxilina de Mayer por um minuto;
- **lavagem** em água corrente e passagem em água destilada;
- **passagem em água amoniacal** por alguns segundos para evidenciar a contra-coloração;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada;
- **desidratação** em gradiente crescente de álcoois;
- **passagem** em três xilóis;
- **montagem** das lamínulas com resina Entellan (Merck, 7961).

