

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE - UFCSPA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Lorenza Bridi Todeschini

**Análise Clínica, Histopatológica e
Imunohistoquímica do Carcinoma
Escamoso de Vulva.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2023

Lorenza Bridi Todeschini

Análise Clínica, Histopatológica e Imunohistoquímica do Carcinoma Escamoso de Vulva.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Adriana Vial Roehle

Coorientadora: Dra. Rita de Cássia Sant'anna Alves

Porto Alegre

2023

Catálogo na Publicação

Bridi Todeschini, Lorenza
Análise Clínica, Histopatológica e
Imunohistoquímica do Carcinoma Escamoso de Vulva /
Lorenza Bridi
Todeschini. -- 2023.
63 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,
Programa de
Pós-Graduação em Patologia, 2023.

Orientador(a): Adriana Vial Roehe ;
coorientador(a): Rita de Cássia Sant'Anna Alves.

1. carcinoma escamoso de vulva. 2.
imunohistoquímica. 3. PDL1. 4. p16. 5. p53. I.
Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço a todos os preceptores, professores e orientadores que contribuíram para a elaboração e execução deste trabalho. Gratidão à família e aos amigos que estiveram presentes e auxiliaram neste momento.

Agradeço também às pacientes que foram o motivo principal da existência deste projeto.

Resumo da Dissertação

Introdução: Um aumento de cerca de 14% na incidência do carcinoma de células escamosas (CEC) de vulva em mulheres mais jovens tem sido demonstrado. O CEC de vulva relacionado ao papilomavírus humano (HPV) apresenta expressão de p16 e parece ter melhor prognóstico. A p53 anormalmente expressa e o PDL1 estão presentes nos casos não associados ao HPV. **Objetivos:** Avaliar correlação entre os marcadores imunohistoquímicos p16, p53 e PDL1 no CEC de vulva e sua relação com características clínicas e anatomopatológicas. **Material e métodos:** Foi realizada uma revisão histopatológica de 41 lâminas de CEC de vulva, coletadas entre 2016 e 2021. Em seguida, foram realizadas reações imunohistoquímicas com anticorpos para p16, p53 e PDL1. O resultado foi correlacionado com as características clínicas e anatomopatológicas da doença. **Resultados:** A média de idade das pacientes foi de 72,1 anos. O p16 foi positivo em 24,4% dos casos, e o PDL1 foi positivo em 17,1%. O p53 estava ausente em 19,5% das amostras e superexpresso em 24,4% dos casos. Houve correlação entre a profundidade da invasão tumoral e a expressão de p16 e p53. Casos positivos para p16 apresentaram menor profundidade de invasão do que os negativos (1,1 mm *versus* 1,8 mm) ($p= 0.014$). A média da profundidade de invasão foi maior nos casos de expressão alterada do p53 (1,9 mm *versus* 1,4 mm) ($p= 0.041$). A correlação entre a expressão do PDL1 e infiltrado inflamatório acentuado teve um $p= 0.055$. Os casos de invasão linfática (5%) eram p16 negativos. **Conclusões:** Houve correlação inversa entre p53 alterado e presença do p16 e relação entre maior profundidade de

invasão tumoral com p53 alterado e p16 ausente. **Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas da vulva, imunohistoquímica, HPV, p16, p53, PDL1.

Abstract

Introduction: An increase of about 14% in the incidence of squamous cell carcinoma (SCC) of the vulva in younger women has been demonstrated. SCC of the vulva correlated with Human Papilloma Virus (HPV) has a better prognosis and shows expression of immunohistochemical (IHC) marker p16. Abnormally expressed p53 and PDL1 are present in cases not HPV-related. **Aim of study:** Evaluate the correlation between p16, p53 and PDL1 markers with SCC, as well as to relate it to its clinical and pathological factors. **Materials and methods:** It was performed a histopathologic review of 41 slides of SCC of the vulva collected from 2016 to 2021. After that, IHC reactions with p16, p53 e PDL1 antibodies were carried out. The result was correlated with clinical and pathological characteristics of the disease. **Results:** The average age of the patients was 72,1 years old. p16 was positive in 24,4% of the cases and PDL1 in 17,1%. p53 was absent in 19,5% of the sample and it was overexpressed in 24,4%. The depth of tumoral invasion showed correlation with p16 and p53 expressions. The cases with positive p16 had a smaller depth of tumoral invasion (1,1 mm *versus* 1,8 mm) ($p=0.014$). In altered p53 expression cases the mean depth of invasion was bigger (1,9 mm *versus* 1,4 mm) ($p=0.041$). There was a correlation trend between PDL1 IHC expression and accentuated inflammatory infiltrate ($p=0.055$). The cases of lymphatic invasion (5%) were p16 negative. **Conclusion:** There was an inverse correlation between altered p53 and presence of p16, and a relation between a bigger depth of tumoral invasion and altered p53 and absence of p16.

Keywords: vulvar squamous cell carcinoma, immunohistochemistry, HPV, p16, p53, PDL1.

Lista de Abreviaturas

AP: anatomopatológico

CDK: quinase ciclina dependente CEC:

carcinoma de células escamosas cm:

centímetro(s)

E6: oncoproteína viral E6

E7: oncoproteína viral E7

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

HE: hematoxilina e eosina

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HPV: papilomavírus humano

HSIL: high grade squamous intraepithelial lesion

IHC: immunohistochemistry

IMC: índice de massa corporal INCA:

Instituto Nacional do Câncer

kg/m²: quilograma por metro quadrado

LAST: Lower Anogenital Squamous Terminology

LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion

mm: milímetro(s)

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

NIV: neoplasia intraepitelial vulvar PCR:

reação em cadeia da polimerase *PD-1*:

Programmed Cell Death 1

PDL-1: Programmed Death Ligand 1

pRB: proteína do retinoblastoma p16:

proteína p16NK4a

SCC: squamous cell carcinoma

Lista de Figuras

Figura 1: Ação da p16 no ciclo celular	30
Figura 2: Imunohistoquímica do marcador p16 no CEC de vulva	30
Figura 3: Padrões imunohistoquímicos do marcador p53.....	33
Figura 4: Reação imunohistoquímica com o marcador PD-L1	35

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE VULVA	12
1.2 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE VULVA	13
1.2.1 Fatores de risco.....	15
1.2.2 Estadiamento do câncer de vulva	18
1.3 SIGNIFICADO DA ESPESSURA DA INVASÃO TUMORAL NAS BIÓPSIAS PRÉ- OPERATÓRIAS	19
1.4 TRATAMENTO DO CÂNCER DE VULVA	20
1.5 FATORES PROGNÓSTICOS NO CARCINOMA ESCAMOSO DE VULVA	21
1.6 PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE VULVA EM RELAÇÃO À PRESENÇA DO HPV	26
1.7 IMUNOHISTOQUÍMICA NO CARCINOMA ESCAMOSO DE VULVA	28
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
3. OBJETIVOS	42
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	43
5. CONCLUSÕES	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
APÊNDICE A – Instrumento de coleta de dados da vulvosopia anatomopatologia e imunohistoquímica	66
ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP	70

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE VULVA

O câncer de vulva é uma neoplasia de incidência rara, quando comparado a outros tumores malignos do trato reprodutivo feminino. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) não dispõe de estimativa de incidência para o câncer de vulva. Mas, de acordo com a American Cancer Society, a doença representa em torno de 6% dos cânceres que acometem o trato genital feminino e 0,7% dos cânceres que acometem mulheres. Estima-se que, no ano de 2022, 6330 mulheres foram diagnosticadas com essa neoplasia e 1650 mulheres morreram em decorrência dela nos Estados Unidos.¹

O tipo histológico mais frequente de câncer de vulva é o carcinoma de células escamosas, que representa entre 80 e 90% dos casos. A maior parte das lesões localiza-se na pele dos grandes e pequenos lábios; lesões na topografia do clitóris e lesões originárias das glândulas vestibulares são extremamente raras.²

Há algumas décadas, trabalhos internacionais, estadunidenses e dinamarqueses têm demonstrado um aumento da incidência do câncer de vulva em mulheres mais jovens. O *FIGO Cancer Report* de 2021, em sua atualização a respeito do câncer de vulva, afirma que a média de idade das pacientes acometidas pela doença tem diminuído nos últimos anos e associa o fenômeno ao aumento da incidência da infecção pelo papiloma vírus humano (HPV).^{3,4,5}

Em uma coorte chinesa de 885 mulheres acompanhadas de 2006 a 2016, a maioria das pacientes que desenvolveram câncer de vulva estavam na

faixa etária de 50 a 60 anos. Trata-se de uma redução da faixa etária prévia, que geralmente era de 70 anos de idade ou mais.⁶

Com o objetivo de investigar alterações na incidência e na faixa etária das pacientes acometidas pelo câncer de vulva, Kang *et al.* realizaram um estudo epidemiológico cobrindo 20 anos de dados de 13 países considerados desenvolvidos. Foi observado um aumento de 14% na incidência do câncer de vulva, que foi mais expressivo entre pacientes com menos de 60 anos de idade. Nesta faixa etária, a incidência geral aumentou em 38%. Por outro lado, não houve aumento significativo entre mulheres acima de 60 anos.²

Até o momento, não há na literatura um número significativo de trabalhos abordando uma possível mudança no padrão etário e etiológico dos casos de câncer de vulva – tampouco dados suficientes sobre a população brasileira. Tal escassez torna importante a elaboração de trabalhos avaliando o perfil atual dessas pacientes, o que pode também cursar com impacto prognóstico na patologia.

1.2 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE VULVA

O carcinoma escamoso de vulva desenvolve-se a partir de duas vias principais de lesões precursoras (as neoplasias intraepiteliais vulvares, NIVs): um subtipo relacionado ao HPV e outro não relacionado a essa infecção viral.⁷

De acordo com a terminologia *Lower Anogenital Squamous Terminology* (LAST) de 2012, a via relacionada à persistência da infecção pelo HPV de alto potencial oncogênico (especialmente os subtipos 16, 18, 31 e 33), também conhecida como NIV usual, surge a partir de lesões precursoras de alto grau

(HSIL). Estas lesões ocorrem mais frequentemente em mulheres jovens, apresentando uma morfologia basaloide ou verrucosa. Também relacionadas à infecção pelo HPV, as lesões de baixo grau (LSIL) correspondem aos condilomas e lesões que representam sinais de infecção pelo vírus, mas que não tem alto potencial oncogênico.^{7,8,9}

A via carcinogênica não relacionada ao HPV (NIV diferenciada) é mais comum em mulheres idosas, com morfologia de epitélio escamoso queratinizante bem diferenciado e correlação com patologias vulvares inflamatórias – destacando-se, entre elas, o líquen escleroso.^{7,8,9}

Entre as duas vias de lesões precursoras, também há diferença entre a incidência e a taxa de progressão para o carcinoma invasor. A via da NIV diferenciada representa menos de 5% dos casos de lesão pré-neoplásica vulvar, porém apresenta maior taxa de progressão para a invasão, ocorre em um menor intervalo de tempo e tem maior taxa de recorrência do que a NIV usual. Menos de 2% dos casos de NIV diferenciada possuem associação com infecção pelo HPV.⁵ (Quadro 1)

Quadro 1: Vias precursoras para o surgimento do carcinoma escamoso de vulva.

NIV DIFERENCIADA	NIV USUAL
------------------	-----------

Independente do HPV	Via da infecção pelo HPV
Menos frequente (em torno de 5% dos casos)	Mais frequente (em torno de 95% dos casos)
Associada à idade, irritação tecidual, estresse oxidativo e inflamação crônica (ex.: líquen escleroso)	Associada à imunossupressão (HIV, transplantes), tabagismo, número de parceiros sexuais, infecção pelo HPV
Pacientes entre 60 e 80 anos	Pacientes entre 30 e 50 anos
Lesões unifocais e unicêntricas	Lesões multifocais e multicêntricas
Progressão para câncer em torno de 35%	Progressão para câncer em torno de 5%

Fonte: Adaptado de Hoang *et al.*¹⁰

1.2.1 Fatores de risco

São fatores de risco para o carcinoma escamoso de vulva: histórico progressivo pessoal de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3); etnia caucasiana; tabagismo; imunossupressão; obesidade e menopausa em idade inferior a 50 anos.^{8, 11} Também incorre em risco a presença de dermatoses inflamatórias genitais, como o líquen escleroso e o líquen plano.^{5,12}

Por outro lado, a idade da menarca, histórico de histerectomia, o uso de terapia de reposição hormonal, o uso de métodos contraceptivos hormonais orais ou de laqueadura tubária não estão associados ao risco aumentado de desenvolver câncer de vulva.¹¹

A paridade aparece como fator de risco em um trabalho (para três ou mais gestações)⁶, mas não teve significância estatística em outros.¹¹

Histórico progressivo de NIC 3

Um dos fatores de risco mais bem estabelecidos para o surgimento do carcinoma escamoso de vulva é o histórico progressivo pessoal de NIC 3 (uma lesão precursora do câncer de colo uterino), o que corrobora a associação da infecção pelo HPV com uma

das vias originárias do carcinoma de vulva. Um estudo de coorte que acompanhou 1,3 milhões de mulheres no Reino Unido durante 14 anos mostrou que apresentar NIC 3 previamente aumenta em mais de 50% o risco de se desenvolver carcinoma vulvar, em comparação às mulheres sem esse histórico.¹¹

Etnia caucasiana

Uma coorte estadunidense demonstrou uma maior incidência de câncer de vulva em mulheres brancas quando comparado às não brancas. O motivo permanece em estudo até o momento, uma vez que etnias não caucasianas apresentam maior risco para o câncer de colo uterino. Uma hipótese para este fenômeno é de que a via não relacionada ao HPV seja a predominante nessas mulheres.^{8, 13}

Tabagismo

O tabagismo possivelmente aumenta o risco de ocorrência das lesões precursoras e invasoras do carcinoma escamoso de vulva a partir do aumento do efeito do HPV, assim como ocorre na cérvix uterina.^{6, 8} Em um estudo de caso-controle dinamarquês publicado em 2008, o tabagismo foi associado a um risco mais de duas vezes maior para o carcinoma escamoso de vulva, quando comparado a pacientes não tabagistas.¹⁴

Todavia, a coorte avaliada por Coffey *et al.* não mostrou relação entre o hábito de fumar e o câncer de vulva.¹¹

Imunossupressão

A imunossupressão também representa um fator de risco, majoritariamente associado à via da NIV usual, a partir da infecção pelo HPV.⁵

Obesidade

A obesidade (IMC acima de 30kg/m²), particularmente em mulheres acima dos 50 anos de idade, também foi associada a um risco elevado de surgimento de carcinoma vulvar de células escamosas. Não há aumento de risco em relação aos outros subtipos de carcinoma vulvar (basocelular, melanoma e glandular).¹¹

Menopausa em idade inferior a 50 anos

Menopausa em idade inferior a 50 anos, fisiológica ou em decorrência de ooforectomia bilateral, aumentou o risco de incidência do carcinoma escamoso de vulva em 52% quando comparado às mulheres que tiveram sua menopausa com 50 anos de idade ou mais.¹¹

Dermatoses inflamatórias

Em trabalho chinês publicado em 2017, uma análise retrospectiva de 885 pacientes admitidas em um hospital universitário por doenças vulvares, aproximadamente 5% das pacientes com doenças epiteliais vulvares não neoplásicas desenvolveram câncer vulvar.⁶

A inflamação crônica com processos cicatriciais é associada ao carcinoma vulvar. O líquen escleroso, por exemplo, é uma dermatose inflamatória caracterizada por sua cronicidade e pela fibrose hipocelular (esclerose).^{15, 16} Um estudo finlandês que seguiu 7616 pacientes com diagnóstico de líquen escleroso vulvar, de 1970 a 2014, demonstrou aumento do risco de câncer de vulva – 182 pacientes foram diagnosticadas com a complicação.¹²

O líquen plano também figura entre os fatores de risco para o câncer de vulva, embora seja mais raro e esteja menos associado com a progressão para a patologia do que o líquen escleroso.^{17, 18, 19}

1.2.2 Estadiamento do câncer de vulva

O estadiamento do câncer de vulva é cirúrgico desde 1988, sendo que o estadiamento final se baseia na avaliação histológica da peça vulvar e da peça ou peças linfonodais.⁵

O novo estadiamento de câncer de vulva elaborado pelo Comitê de Ginecologia Oncológica da FIGO, descrito abaixo, se aplica a quase todos os tumores malignos de vulva, exceto o melanoma.⁵ (Quadro 2)

Estadiamento	Descrição	
I	Tumor confinado à vulva	
	IA	Tumor ≤ 2 cm e invasão estromal ≤ 1 mm ^a
	IB	Tumor > 2 cm ou invasão estromal > 1 mm ^a
II	Tumor de qualquer tamanho com extensão para o terço inferior da uretra, terço inferior da vagina e terço inferior do ânus com linfonodos negativos	
III	Tumor de qualquer tamanho com extensão para a parte superior de estruturas perineais adjacentes e com qualquer número de linfonodos não aderidos e não ulcerados	
	III A	Tumor de qualquer tamanho com extensão para os dois terços superiores da uretra, da vagina, mucosa da bexiga, mucosa do reto ou metástases em linfonodos regionais ≤ 5 mm
	III B	Metástase em linfonodos regionais ^b > 5 mm
	III C	Metástase em linfonodos regionais ^b com acometimento extracapsular
IV	Tumor de qualquer tamanho aderido ao osso ou metástases linfonodais aderidas ou ulceradas ou metástases à distância	
	IV A	Tumor aderido ao osso pélvico ou metástases em linfonodos regionais ^b aderidos ou ulcerados
	IV B	Metástases à distância

a: A profundidade da invasão é a medida da membrana basal da porção mais profunda adjacente displásica sem tumor do *rete ridge* (ou do *rete peg* displásico mais próximo) até o ponto mais profundo de invasão.

b: “Regional” refere-se aos linfonodos inguinais e femorais.

Fonte: Adaptado de Olawaiye *et al.*⁵

1.3 SIGNIFICADO DA ESPESSURA DA INVASÃO TUMORAL NAS BIÓPSIAS PRÉ-OPERATÓRIAS

Um dos principais fatores prognósticos no carcinoma escamoso de vulva é o acometimento linfonodal. Assim, uma das mais importantes formas de reduzir a mortalidade desta patologia é a abordagem adequada dessas estruturas, quando necessário.^{20,21}

Uma das indicações da abordagem cirúrgica linfonodal é a invasãoestromal do tumor acima de 1 mm de espessura, podendo ser a biópsia de linfonodo sentinela ou a linfadenectomia inguinal, a depender de outros fatores. Por exemplo, em caso de lesão tumoral única com menos de 4 cm de diâmetro, sem linfonodos inguinais clinicamente suspeitos, pode-se realizar a biópsia de linfonodo sentinela. O benefício desta biópsia consiste em reduzir a morbidade do esvaziamento inguinal, que pode incorrer em linfocele mas também em complicações na cicatrização pós-operatória.^{20,21}

A consideração da espessura da invasão tumoral na biópsia pré-operatória poderia reduzir a morbidade, evitando uma segunda intervenção cirúrgica para realizar a abordagem linfonodal posteriormente. Também deve-se considerar que uma segunda abordagem para acessar os linfonodos inguinais é um procedimento mais complexo, pois, uma vez que o tumor foi ressecado, a injeção de marcador para o linfonodo sentinela não é mais possível e a acurácia da intervenção pode ser menor. A segurança oncológica de uma abordagem linfonodal secundária ainda não está bem estabelecida.²⁰

Todavia, um dos empecilhos relacionados à consideração da espessura tumoral na biópsia pré-operatória é a discrepância que pode ocorrer entre essa medida e a medida da espessura na peça operatória final. Pahmeyer *et al.*, em trabalho de 2020, encontraram em 89,6% dos casos estudados uma diferença de pelo menos 1 mm entre a medida de espessura tumoral na biópsia pré-operatória e na peça cirúrgica. Em 22,1% dos pacientes, a espessura tumoral na biópsia pré-operatória não foi capaz de predizer a

necessidade de abordagem linfonodal, sendo a medida subestimada.²⁰

1.4 TRATAMENTO DO CÂNCER DE VULVA

O tratamento do câncer de vulva depende do estadiamento e da histologia do tumor. Também influenciam a idade da paciente, a existência de comorbidades e o status performance da paciente na escolha das terapias.⁵

Especialmente no caso do carcinoma de células escamosas da vulva, o tratamento é cirúrgico. Pode-se utilizar também a quimiorradioterapia como alternativa, principalmente para tumores avançados. A quimioterapia e a imunoterapia podem ser alternativas em casos metastáticos ou paliativos.⁵

O tratamento cirúrgico do carcinoma vulvar inclui a ressecção da lesão e uma hemivulvectomy ou vulvectomy radical, se necessário, a depender da extensão do tumor. Conforme o estadiamento e a localização da lesão, também pode ser necessária a linfadenectomia uni ou bilateral, procedimentos que cursam com uma morbidade significativa. As possíveis complicações incluem infecção, linfedema e disfunções sexuais.^{22, 23, 24} Gaarenstroom *et al.* encontraram uma ou mais complicações pós-operatórias em 76% das 101 pacientes acompanhadas.²⁴

Já em caso de doença de estadiamento avançado, há poucas opções de tratamento disponíveis, que geralmente envolvem a ressecção da lesão conforme possível e adjuvância com quimiorradioterapia.^{22, 23, 24}

A recorrência do câncer de vulva é de 12 a 50%, e a doença recorrente está associada a uma sobrevida em cinco anos de 25 a 35%. Cerca de 80% dos casos de recorrência acontecem nos primeiros dois anos pós-tratamento.²⁵

1.5 FATORES PROGNÓSTICOS NO CARCINOMA ESCAMOSO DE VULVA

Dentre os fatores prognósticos, o comprometimento linfonodal e o estágio de

acordo com a FIGO são os mais citados nas pesquisas. Existem ainda outros fatores que variam em diferentes trabalhos, explorados nos próximos tópicos. O fator HPV tem tido relevância crescente no aspecto prognóstico, como também comentado a seguir.

Idade

Raspagliesi *et al.* encontraram significância estatística para o fator idade quanto à sobrevida das pacientes. Em dez anos, a sobrevida foi de 100% em pacientes com menos de 30 anos de idade e de 53% em pacientes com mais de 60 anos de idade.²⁶ Já Miljanović-Špika *et al.* não encontraram relevância estatística para o fator idade no prognóstico de sobrevida das pacientes.²⁷ Todavia, o trabalho de Raspagliesi *et al.* contou com 389 pacientes analisadas, enquanto o segundo trabalho teve uma população de 59 mulheres.

Comprometimento linfonodal e invasão do espaço linfovascular

O status linfonodal parece ser um dos fatores prognósticos mais relevantes, seguido pelo comprometimento do espaço linfovascular.^{25,28}

De acordo com a literatura, quanto mais linfonodos comprometidos, pior o prognóstico.^{27,29} Em uma das análises, pacientes com comprometimento linfonodal apresentavam risco de óbito de 3,47 vezes maior, enquanto

pacientes com comprometimento do espaço linfovascular, apresentavam risco de óbito de 2,06 vezes maior.²⁷

Em trabalho de 2006, a sobrevida em 10 anos em caso de comprometimento do espaço linfovascular foi de 30%, enquanto as pacientes sem comprometimento tiveram 61% de sobrevida no mesmo período²⁶.

O status linfonodal foi o fator prognóstico independente mais significativo³⁰. Em relação ao comprometimento linfonodal, a extensão do tumor para o sítio extracapsular parece ser o fator mais relevante³¹.

Paladini *et al.* encontraram uma sobrevida de 37% em 5 anos em pacientes sem comprometimento linfovascular *versus* 18% em pacientes com comprometimento linfovascular ($p < 0.02$)³¹.

Estadiamento de acordo com a FIGO

O estadiamento do CEC de vulva de acordo com a FIGO parece ser um fator prognóstico estatisticamente significativo³¹.

Em alguns trabalhos, o estágio II ou maior parece estar relacionado a um pior prognóstico. A sobrevida em 5 anos reportada para o estágio I varia de 90% a 100%, enquanto para o estágio IV é de 0%.^{27,32}

Adjuvância com quimiorradioterapia

No estudo de Miljanović-Špika *et al.*, o fato de ter recebido adjuvância com quimiorradioterapia foi um fator de pior prognóstico.²⁷ Isso se deve,

possivelmente, ao fato de que as pacientes que tiveram indicação de adjuvância foram detectadas com tumores maiores e em um estágio mais avançado da neoplasia, com comprometimento linfonodal, o que, por si só, já acarreta um pior prognóstico.³³

Diâmetro do tumor

Enquanto alguns estudos demonstraram que o diâmetro do tumor possui significância estatística em seu prognóstico, outros tangenciaram a margem de significado estatístico ou não encontraram relevância.^{26, 31}

Contudo, um ponto importante levantado pelo trabalho de Raspagliesi *et al.* é que o diâmetro tumoral é preditivo de metástases linfonodais, o que impacta no prognóstico.²⁶

Para Paladini *et al.*, a sobrevida em 5 anos foi de 44% para pacientes com tumores menores de 4 cm e 12% para pacientes com tumores maiores de 4 cm ($p < 0.003$).³¹

Grau histológico do tumor

O grau histológico do tumor é dividido em G1, G2 e G3: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, respectivamente.⁵ Apesar da hipótese de maior sobrevida para os tumores bem diferenciados (G1), a maior parte dos trabalhos revisados para esta análise não encontraram significância estatística nesta correlação.^{26, 27, 28}

Margens cirúrgicas

Margens exíguas ou positivas na peça cirúrgica possuem maior risco de recorrência local.^{25, 34, 35} A margem de segurança sugerida atualmente é de pelo menos 8 mm, embora alguns trabalhos mais recentes explorem a hipótese de não haver diferença na recorrência local com uma margem menor do que essa.²⁸ Outra possibilidade considerada é de que o risco de recorrência em relação à margem cirúrgica seja diferente para tumores relacionados ao HPV e para tumores não relacionados.²⁸

Característica da lesão tumoral: ulcerada *versus* exofítica

No trabalho de Raspagliesi *et al.*, o prognóstico para pacientes com lesões tumorais ulceradas foi pior do que o das pacientes com lesões tumorais exofíticas (sobrevida em 10 anos de 53.3% versus 67.3%).²⁶

Profundidade da invasão tumoral

Raspagliesi *et al.* não encontraram significância estatística na profundidade da invasão tumoral quanto ao prognóstico²⁶. Miljanović-Špika *et al.* também não encontraram correlação entre esta medida e o prognóstico de sobrevida.²⁷

Já Nicoletto *et al.* encontraram correlação entre invasão tumoral maior de 9 mm e impacto na sobrevida. Em caso de invasão de até 9 mm, a sobrevida em cinco anos foi de 61%, enquanto nas pacientes com invasão

tumoral acima de 9 mm, a sobrevida foi de 25% no mesmo período ($p=0.0232$).³⁴

Em trabalho de Paladini *et al.*, a profundidade da invasão tumoral tangenciou a significância estatística ($p= 0.052$) quanto ao impacto na sobrevida. Neste estudo, em 5 anos, a sobrevida das pacientes com invasão de 3 mm foi de 61%, com invasão de 4 a 10 mm foi de 38% e em invasão acima de 10 mm, 0%.³¹

1.6 PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE VULVA EM RELAÇÃO À PRESENÇA DO HPV

Trabalhos recentes têm demonstrado que cânceres de vulva relacionados ao vírus do HPV apresentam melhor prognóstico em comparação aos casos não relacionados a essa infecção viral. Diversos mecanismos podem explicar este achado, como uma maior radiosensibilidade dos tumores associados ao HPV, assim como já se observa em tumores de etiologia escamosa de cabeça e pescoço.^{26, 27, 28, 29}

Os tumores não associados ao HPV costumam apresentar um comportamento mais agressivo, com maiores taxas de comprometimento das margens cirúrgicas, de recorrência e pior prognóstico.³⁰

Mas os estudos não são homogêneos em relação a esse achado. Pinto *et al.* não encontraram, após análise multivariada, correlação entre o status negativo do HPV e o pior prognóstico das pacientes com câncer de vulva.³⁶ Hørding *et al.* também não encontraram associação entre maior recorrência pós-cirúrgica e status negativo para HPV em trabalho de 1993.³⁷

A presença do HPV também está associada a outras lesões precursoras tumorais e neoplasias invasivas, como de colo uterino, vagina, canal anal e orofaringe. Dessa forma, a diferenciação quanto à via precursora do carcinoma de células escamosas de vulva, em termos da presença ou não do HPV nessa etiologia, tem impacto no manejo do paciente. Caso a infecção viral esteja associada, deve-se considerar a possibilidade de lesões induzidas pelo microorganismo em outros sítios.³¹

A morfologia isoladamente não permite a diferenciação de forma acurada entre os dois subtipos, uma vez que lesões associadas ao HPV podem apresentar queratinização, mimetizando tumores que não tem relação com a infecção viral, por exemplo. Essa diferenciação pode ser realizada a partir do marcador imunohistoquímico p16, assim como nos tumores orofaríngeos.^{29, 35} Em trabalho de Santos *et al.*, o marcador p16 apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98,7% para detectar carcinoma de vulva associado ao HPV, revelando-se um marcador confiável para a presença do vírus.³⁸ Alos *et al.* identificaram uma positividade de 100% para o p16 em tumores nasossinusais associados ao HPV.³⁹ Tanto o trabalho de Santos *et al.* quanto o trabalho de Alos *et al.* utilizaram a biologia molecular, através do PCR, para a confirmação da presença viral e comparação com a presença do p16.

Em casos duvidosos, como naqueles em que o p16 apresenta forte positividade, mas a clínica e a histologia sugerem tumor não relacionado ao HPV, pode-se utilizar métodos de biologia molecular, como o DNA-HPV ou PCR HPV.³¹

1.7 IMUNOHISTOQUÍMICA NO CARCINOMA ESCAMOSO DE VULVA

Expressão da p16

A proteína p16INK4a (p16) é uma inibidora de quinase ciclina dependente, parte do grupo INK4a, que pode agir em quinases ciclina dependentes (CDKs) e então inativar a progressão do ciclo celular. Essa inativação ocorre através da interferência na montagem da ciclina D-CDK4/6, inibindo a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular.⁴⁰ (Figura 1)

A perda da expressão das proteínas da família INK4 foi encontrada em outras neoplasias, como no adenocarcinoma de estômago, podendo ser um evento inicial do processo carcinogênico.^{40,41}

O HPV, ao se integrar ao genoma celular das células escamosas do seu hospedeiro, ocasiona um aumento na expressão das proteínas oncogênicas virais E6 e E7, que então interagem com proteínas celulares específicas e iniciam a transformação neoplásica. A proteína E7 liga-se à proteína supressora tumoral pRB, levando à degradação desta, a uma regulação positiva das CDKs e ao aumento da expressão da p16 no núcleo celular e no citoplasma.⁴⁰

Além de marcador para a presença do HPV, a expressão da p16 pode também ser um fator prognóstico do tumor, como já observado em tumores de cabeça, pescoço e vagina, podendo refletir maior sensibilidade aos tratamentos radioterápicos e melhor prognóstico.^{27, 36, 39, 40, 42, 43}

De acordo com Hellman *et al.*, a proteína p16 pode ser utilizada como um marcador da presença do HPV no carcinoma escamoso de vagina.⁴⁴ Outros trabalhos demonstraram a correlação entre a positividade para o HPV (avaliada através de marcadores moleculares como o DNA-HPV) e a expressão da proteína p16 em tumores de tonsila, orofaringe e nasossinusais.^{29, 36, 39, 40, 42, 43}

Também já há uma maior consolidação no uso clínico da p16 em casos de lesões precursoras do câncer do colo do útero, mostrando uma correlação entre a presença da proteína e a severidade da displasia cervical.^{37, 45}

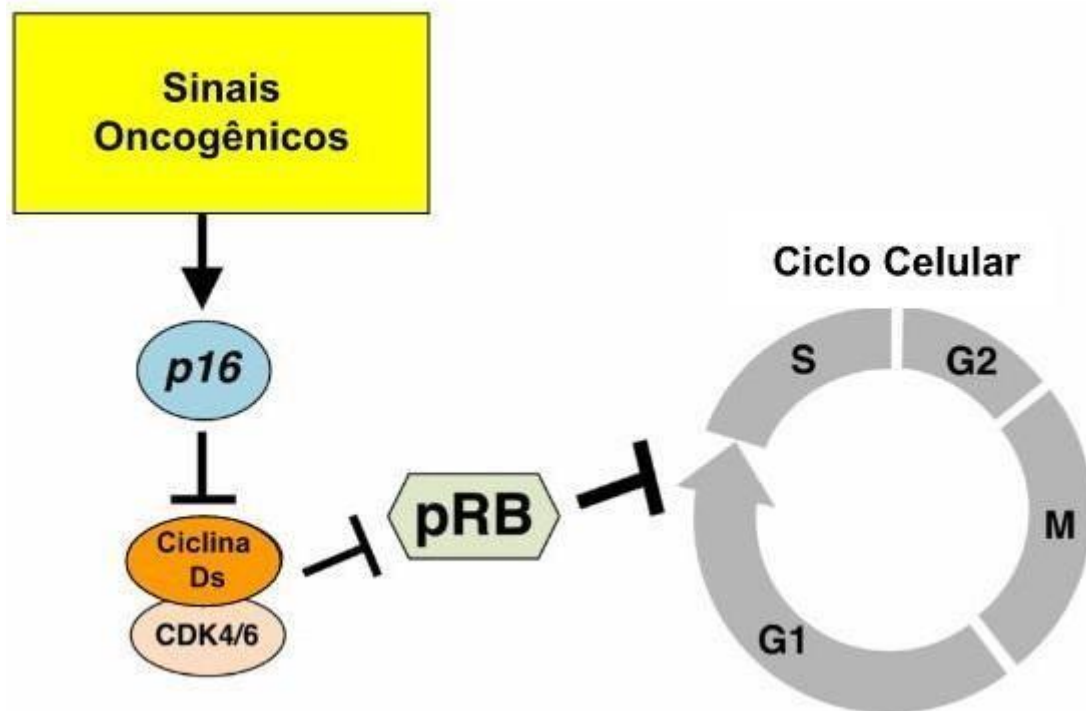
O'Neill e McCluggage, em trabalho avaliando a expressão de p16 no trato genital feminino e seu valor prognóstico, encontraram positividade do marcador na NIV associada ao HPV, bem como no carcinoma escamoso associado à infecção. As NIVs não associadas ao HPV não apresentaram positividade do p16, sendo totalmente negativas para o marcador ou apenas focalmente positivas.⁴⁶

Proctor *et al.* verificaram uma maior radiosensibilidade dos carcinomas escamosos de vulva induzidos pelo HPV e associados ao p16, além de melhores resultados em sobrevida livre de doença. As pacientes com o marcador positivo que receberam quimioterapia sensibilizante também apresentaram melhor prognóstico.⁴⁰

No estudo de Cao *et al.*, a expressão da p16 se correlacionou com estádios tumorais mais precoces da FIGO, ausência de metástases linfonodais e idade menor das pacientes, indicando um melhor prognóstico para os indivíduos com a positividade deste marcador imunohistoquímico em caso de câncer de vulva.⁴⁷

De acordo com Tringler *et al.*, pacientes com carcinoma escamoso de vulva positivos para p16 apresentaram uma maior sobrevida global. Os autores sugerem que o marcador imunohistoquímico pode agregar valor prognóstico em casos de câncer de vulva.⁴⁸ (Figura 2)

Figura 1: Ação da p16 no ciclo celular.

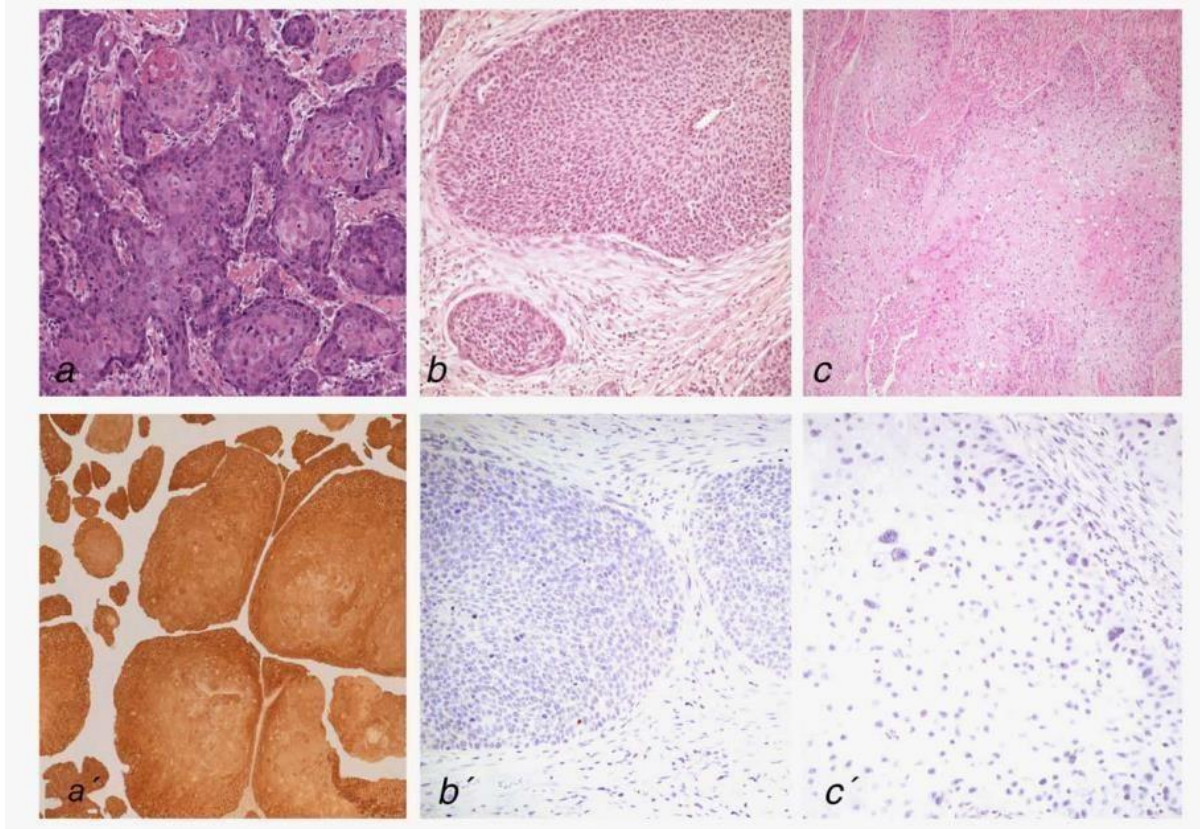


CDK4/6: quinase dependente de ciclina 4/6; G1: primeiro intervalo; S: síntese de DNA; G2: segundo intervalo.

Legenda: A figura representa o envolvimento da proteína p16 na interrupção do ciclo celular mediado por pRB, induzido por sinais oncogênicos. A p16 é induzida por sinais oncogênicos, resultando em uma parada da fase G1 do ciclo celular mediada por pRB, para proteger as células da hiperproliferação.

Fonte: Adaptado de Kotake *et al.*⁴⁹.

Figura 2: Imunohistoquímica do marcador p16 no CEC de vulva.



Legenda: Nas figuras a e a', observa-se a hematoxilina e eosina de um CEC queratinizado de vulva relacionado ao HPV e a reação positiva para p16 da mesma amostra. A associação ao HPV também foi demonstrada com o uso de biologia molecular. Nas imagens b e b', observa-se um CEC basaloide na hematoxilina e eosina e na reação imunohistoquímica com p16, negativa, respectivamente. Nas figuras c e c', visualiza-se um CEC do tipo "wart", na hematoxilina e eosina e na reação imunohistoquímica com p16, negativa, respectivamente. As amostras das figuras b e c também foram submetidas à análise com biologia molecular para HPV, ambas negativas.

Fonte: Adaptada de Rakislova *et al.*⁵⁰.

A proteína p53 é uma supressora tumoral bastante relevante na manutenção da integridade do DNA, e a sua mutação ou deleção é uma parte importante do surgimento e progressão da maioria dos tumores.⁵¹

A oncoproteína E6, superexpressa após a integração do DNA HPV de alto risco carcinogênico ao genoma do hospedeiro, promove a rápida degradação da p53. Em casos de câncer de vulva não relacionados à infecção pelo HPV, pode-se encontrar a expressão disfuncional da proteína p53, devido à mutação do gene p53. Assim, podemos encontrar a expressão imunohistoquímica da p53 em seu tipo selvagem em casos de carcinoma de vulva relacionados e não relacionados ao HPV, porém surgida a partir de diferentes mecanismos para cada etiologia.⁵¹

A detecção da p53 a partir da imunohistoquímica é associada com a presença de formas mutadas do gene TP53. A forma normal da proteína p53 apresenta uma meia-vida curta, com um nível muito baixo para ser detectada pelos métodos imunohistoquímicos. Já a proteína p53 mutante apresenta uma meia-vida mais longa, sendo detectada mais facilmente através da imunohistoquímica.^{7,51} (Figura 3)

De acordo com Rakislova *et al.*, foi infrequente a associação entre a presença do marcador p53 de forma anormal e carcinoma escamoso de vulva induzido pelo HPV.⁵⁰ Estima-se que o p53 expresso de forma anormal esteja presente em cerca de dois terços dos cânceres de vulva não relacionados à via do HPV.^{42, 47} O padrão mutante da p53 indica a importância do stress oxidativo na etiologia da carcinogênese vulvar, por exemplo, como ocorre nos casos relacionados ao líquen escleroso.⁵²

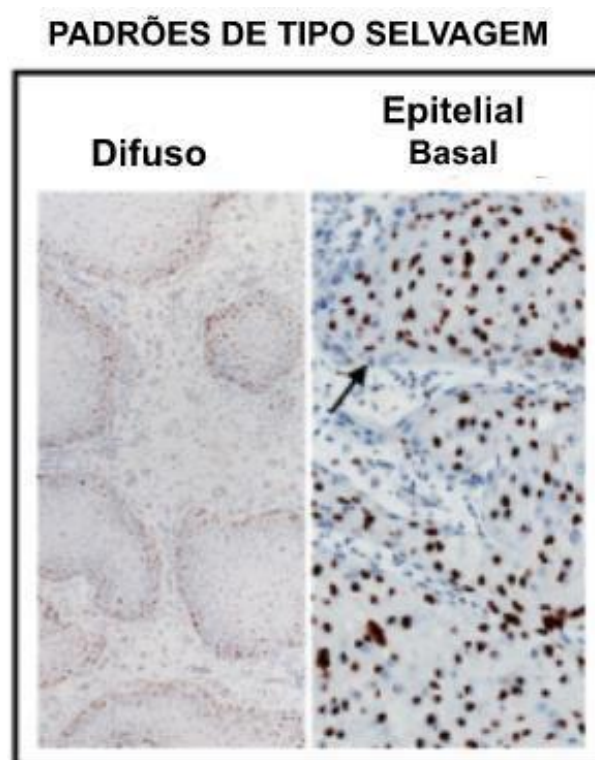
Quanto ao seu potencial prognóstico, a p53 mostrou que pode ser um possível marcador para tal em tumores de cabeça e pescoço. Tenta-se verificar a possibilidade de correlação prognóstica em casos de tumores de vulva, porém os dados são mais

escassos.^{7, 53}

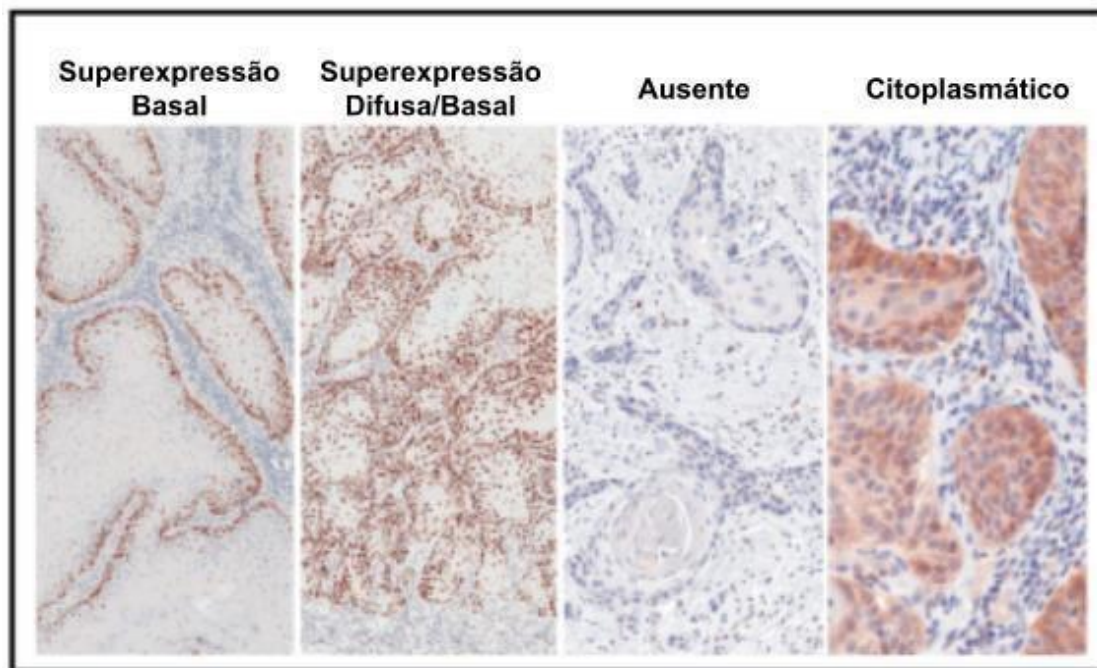
Choschick *et al.* não encontraram correlação entre a presença de p53 mutante e estadiamento tumoral, grau histológico, acometimento linfonodal, profundidade da invasão ou prognóstico.⁵⁴ McConnell *et al.* também não encontraram correlação prognóstica com a presença de p53.⁵⁵

Já Kohlberger *et al.* verificaram que a sobrevida para as pacientes com positividade para p53 parece ser menor do que para as que não apresentam o marcador.³⁰

Figura 3: Padrões imunohistoquímicos do marcador p53.



PADRÕES ALTERADOS



Legenda: No primeiro quadro vemos dois padrões de expressão de p53 dentro da normalidade na imunohistoquímica. No segundo quadro, observam-se quatro formas de expressão alterada da p53 na imunohistoquímica.

Fonte: Adaptada de Tessier-Cloutier *et al.*³³

Expressão da PD-L1

A PD-L1, também chamada de B7-H1, é uma proteína expressa por células tumorais que pode auxiliá-las a escapar da detecção do sistema imune do organismo, ligando-se ao receptor de morte celular programada PD-1 expresso nos linfócitos T. Essa interação PD-1/PD-L1 regula negativamente a proliferação e a função dos linfócitos T, permitindo que o tumor não seja detectado pelo sistema imunológico.^{47, 56}

Encontram-se níveis de PD-L1 em diversos tipos de tumores sólidos, como melanoma, carcinoma renal, carcinoma de bexiga e carcinoma de

pulmão não pequenas células, geralmente resultando em um mau prognóstico.^{49, 50, 54, 57}

O bloqueio da interação PD-1/PD-L1 oferece uma alternativa de tratamento imunoterápico, melhorando a função das células. T^{48, 54}

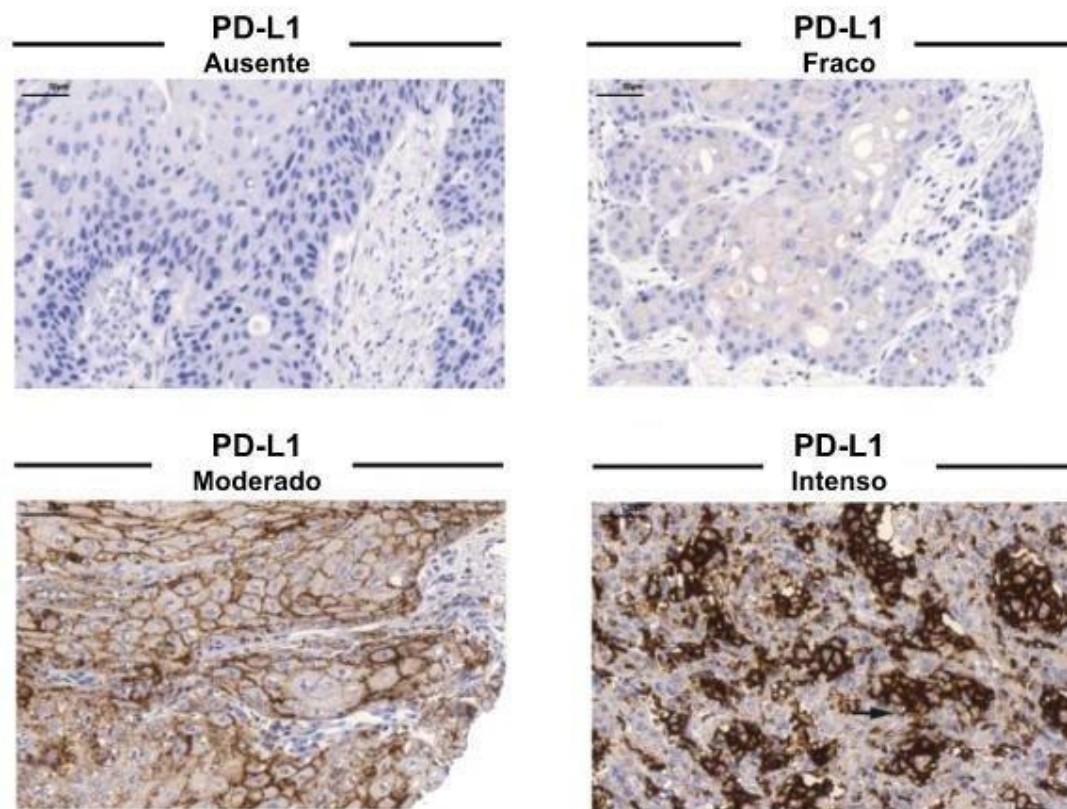
Hecking *et al.* encontraram que a expressão de PD-L1 em carcinomas escamosos de vulva ocorreu mais frequentemente em casos HPV-negativos, fato confirmado pela observação de PD-L1 positivo na ausência do marcador p16⁵⁸. Já Mezache *et al.* encontraram positividade do PD-L1 em 95% das lesões pré-neoplásicas de colo uterino e em 80% das lesões de carcinoma escamoso cervical (lesões associadas ao HPV).⁵⁹

De acordo com Cocks *et al.*, pacientes cujos carcinomas de vulva apresentavam expressão alta de PD-L1 tinham maior risco de recorrência da doença e maior mortalidade.²²

A imunoterapia pode ser uma alternativa de tratamento interessante para pacientes com carcinoma de vulva, visto que esta é geralmente uma população com mais de 60 anos de idade e com comorbidades – situação que pode tornar os tratamentos tradicionais, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, mais passíveis de complicações.²²

Acredita-se que pacientes com infiltrado inflamatório tumoral mais acentuado apresentam uma melhor resposta imunológica do hospedeiro.³² Em pacientes com o marcador imunohistoquímico PDL1 presente, em diferentes tumores, parece haver uma maior resposta inflamatória, o que pode demonstrar uma chance maior de se ter uma boa resposta ao bloqueio imunoterápico PD-1/PDL-1.^{22, 55} (Figura 4)

Figura 4: Reação imunohistoquímica com o marcador PD-L1.



Legenda: Demonstração da reação imunohistoquímica com o marcador PD-L1. A primeira imagem representa a reação negativa, com ausência de expressão do marcador. A segunda imagem representa reação fraca ao PD-L1; a terceira imagem, reação moderada; a quarta imagem, reação forte.

Fonte: Adaptado de Hecking *et al.*⁵⁸.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2022. Atlanta: American Cancer Society; 2022.
2. Kang Y-J, Smith M, Barlow E, Coffey K, Hacker N, Canfell K. Vulvar cancer in high-income countries: Increasing burden of disease. *Int J Cancer*. 2017 Dec;141(11):2174-86.
3. Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-200: a nationwide population-based study. *Gynecol Oncol*. 2011 Jul;122(1):45-9.
4. Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer Causes Control*. 2009 Nov;20(9):1779-82.
5. Olawaiye AB, Cuello MA, Rogers LJ. Cancer of the vulva: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. 2021 Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):7-18.
6. Xiao X, Meng Y-B, Bai P, Zou J, Zhang Y, Nguyen TMB, *et al*. Vulvar cancer in china: epidemiological features and risk analysis. *J Cancer*. 2017 Aug;8(15):2950-8.
7. Sand FL, Nielsen DMB, Frederiksen MH, Rasmussen CL, Kjaer SK. The prognostic value of p16 and p53 expression for survival after vulvar cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2019 Jan;152(1):208-17.
8. Brinton LA, Thistle JE, Liao LM, Trabert B. Epidemiology of vulvar neoplasia in the NIH-AARP Study. *Gynecol Oncol*. 2017 May;145(2):298-304.
9. Bornstein J, Bogliatto F, Haefner HK, Stockdale CK, Preti M, Bohl TG, *et al*. The 2015 international society for the study of vulvovaginal disease (ISSVD) terminology of vulvar squamous intraepithelial lesions. *Obstet Gynecol*. 2016 Feb;127(2):264-8.
10. <https://sciwheel.com/work/bibliography/5701786>
11. Coffey K, Gaitskell K, Beral V, Canfell K, Green J, Reeves G, *et al*. Past cervical intraepithelial neoplasia grade 3, obesity, and earlier menopause are associated with an increased risk of vulval cancer in postmenopausal women. *Br J Cancer*. 2016 Aug;115(5):599-606.
12. Halonen P, Jakobsson M, Heikinheimo O, Riska A, Gissler M, Pukkala E. Lichen sclerosus and risk of cancer. *Int J Cancer*. 2017 May;140(9):1998-2002.
13. Saraiya M, Watson M, Wu X, King JB, Chen VW, Smith JS, *et al*. Incidence of in situ and invasive vulvar cancer in the US, 1998-2003. *Cancer*. 2008 Nov;113(10 Suppl):2865-72.
14. Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJC, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina – population-based case-control study in Denmark. *Int J Cancer*.

2008 Jun;122(12):2827-34.

15. Canason JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, *et al.* 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.* 1998 Sep;29(9):932-48.
16. Bigby SM, Eva LJ, Fong KL, Jones RW. The natural history of vulvar intraepithelial neoplasia, differentiated type: evidence for progression and diagnostic challenges. *Int J Gynecol Pathol.* 2016 Nov;35(6):574-84.
17. Lyra J, Melo C, Figueiredo R, Polonia-Valente R, Falcão V, Beires J, *et al.* Erosive vulvar lichen planus and risk of vulvar neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2021 Jan;25(1):71-5.
18. Vieira-Baptista P, Pérez-López FR, López-Baena MT, Stockdale CK, Preti M, Bornstein J. Risk of development of vulvar cancer in women with lichen sclerosus or lichen planus: a systematic review. *J Low Genit Tract Dis.* 2022 Jul;26(3):250-7.
19. Regauer S, Reich O, Eberz B. Vulvar cancers in women with vulvar lichen planus: a clinicopathological study. *J Am Acad Dermatol.* 2014 Oct;71(4):698-707.
20. Pahmeyer C, Thangarajah F, Ratiu D, Schultheis AM, Schömig-Markiefka B, Mallmann P, *et al.* Preoperative biopsies as predictor for the necessity of inguinal lymph node surgery in squamous cell carcinoma of the vulva-a retrospective tertiary center analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020 Oct;146(10):2709-12.
21. Pouwer A-FW, Bult P, Otte I, van der Brand M, van der Horst J, Harterink LJV, *et al.* Measuring the depth of invasion in vulvar squamous cell carcinoma: interobserver agreement and pitfalls. *Histopathology.* 2019 Sep;75(3):413-20.
22. Cocks M, Chaux A, Jenson EG, Nailler JA, Rodriguez Pena MDC, Tregnago AC, *et al.* Immune checkpoint status and tumor microenvironment in vulvar squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2020 Jul;477(1):93-102.
23. Jones GL, Jacques RM, Thompson J, Wood HJ, Hughes J, Ledger W, *et al.* The impact of surgery for vulval cancer upon health-related quality of life and pelvic floor outcomes during the first year of treatment: a longitudinal, mixed methods study. *Psychooncology.* 2016 Jun;25(6):656-62.
24. Gaarenstroom KN, Kenter GG, Trimpos JB, Agous I, Amant F, Peters AAW, *et al.* Postoperative complications after vulvectomy and inguinofemoral lymphadenectomy using separate groin incisions. *Int J Gynecol Cancer.* 2003 Aug;13(4):522-7.
25. Coulter J, Gleeson N. Local and regional recurrence of vulval cancer: management dilemmas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003 Aug;17(4):663-81.
26. Raspagliesi F, Hanozet F, Ditto A, Solima E, Zanaboni F, Vecchione

- F, *et al.* Clinical and pathological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2006 Aug;102(2):333-7.
27. Miljanović-Špika I, Madunić MD, Topolovec Z, Kujadin Kenjereš D, Vidosavljević D. Prognostic factors for vulvar cancer. *Acta Clin Croat.* 2021 Mar;60(1):25-32.
28. Hoang L, Webster F, Bosse T, Focchi G, Gilks CB, Howitt BE, *et al.* Data set for the reporting of carcinomas of the vulva: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *Int J Gynecol Pathol.* 2022 Nov;41(Suppl 1):S8-S22.
29. Sznurkowski JJ, Milczek T, Emerich J. Prognostic factors and a value of 2009 FIGO staging system in vulvar cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Jun;287(6):1211-8.
30. Kohlberger P, Kainz C, Breitenecker G, Gitsch G, Sliutz G, Kölbl H, *et al.* Prognostic value of immunohistochemically detected p53 expression in vulvar carcinoma. *Cancer.* 1995 Nov;76(10):1786-9.
31. Paladini D, Cross P, Lopes A, Monaghan JM. Prognostic significance of lymph node variables in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer.* 1994 Nov;74(9):2491-6.
32. Konidaris S, Bakas P, Gregoriou O, Kalampokas T, Kondi-Pafiti A. Surgical management of invasive carcinoma of the vulva. A retrospective analysis and review. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2011;32(5):505-8.
33. Tessier-Cloutier B, Kortekaas KE, Thompson E, Pors J, Chen J, Ho J, *et al.* Major p53 immunohistochemical patterns in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod Pathol.* 2020 Aug;33(8):1595-605.
34. Nicoletto MO, Parenti A, Del Bianco P, Lombardi G, Pedrini L, Pizzi S, *et al.* Vulvar cancer: prognostic factors. *Anticancer Res.* 2010 Jun;30(6):2311-7.
35. Viswanathan NA, Pinto AP, Schultz D, Berkowitz R, Crum CP. Relationship of margin status and radiation dose to recurrence in post-operative vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2013 Sep;130(3):545-9.
36. Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrão F, Villa LL. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecol Oncol.* 1999 Jul;74(1):61-7.
37. Hørding U, Kringsholm B, Andreasson B, Visfeldt J, Daugaard S, Bock JE. 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.* 1993 Sep;55(3):394-6.
38. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suárez H, *et al.* p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2006 Nov;30(11):1347-56.
39. Alos L, Moyano S, Nadal A, Alobid I, Blanch JL, Ayala E, *et al.* Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer.* 2009 Jun;115(12):2701-9.

40. Proctor L, Hoang L, Moore J, Thompson E, Leung S, Natesan D, *et al.* Association of human papilloma virus status and response to radiotherapy in vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2020 Jan;30(1):100-6.
41. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak NA, Ridge JA, Pinto H, *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb;100(4):261-9.
42. Rasmussen CL, Sand FL, Hoffmann Frederiksen M, Kaae Andersen K, Kjaer SK. Does HPV status influence survival after vulvar cancer? *Int J Cancer.* 2018 Mar;142(6):1158-65.
43. McAlpine JN, Leung SCY, Cheng A, Miller D, Talhouk A, Gilks CB, *et al.* Human papillomavirus (HPV)-independent vulvar squamous cell carcinoma has a worse prognosis than HPV-associated disease: a retrospective cohort study. *Histopathology.* 2017 Aug;71(2):238-46.
44. Hellman K, Lindquist D, Ranhem C, Wilander E, Andersson S. Human papillomavirus, p16(INK4A), and Ki-67 in relation to clinicopathological variables and survival in primary carcinoma of the vagina. *Br J Cancer.* 2014 Mar;110(6):1561-70.
45. Cheng AS, Naarnezis AN, Jordan S, Singh N, McAlpine JN, Gilks CB. p16 immunostaining allows for accurate subclassification of vulvar squamous cell carcinoma into HPV-associated and HPV-independent cases. *Int J Gynecol Pathol.* 2016 Jul;35(4):385-93.
46. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2006 Jan;13(1):8-15.
47. Cao H, Wang S, Zhang Z, Lou J. Prognostic value of overexpressed p16INK4a in vulvar cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2016 Mar;11(3):e0152459.
48. Tringler B, Grimm C, Dudek G, Zeillinger R, Tempfer C, Speiser P, *et al.* p16INK4a expression in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 Sep;15(3):279-83.
49. Kotake Y, Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H. Transcriptional regulation of the p16 tumor suppressor gene. *Anticancer Res.* 2015 Aug;35(8):4397-401.
50. Rakislova N, Clavero O, Alemany L, Saco A, Quirós B, Lloveras B, *et al.* Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: a study of 1,594 cases. *Int J Cancer.* 2017 Dec;141(12):2517-27.
51. Osanai MH, Edelweiss MIA, Meurer L, Vilwock MM, Cavazzola LT, Ribeiro G, *et al.* Avaliação da expressão imunoistoquímica da proteína p16INK4a no adenocarcinoma de esôfago. *ABCD, arq bras cir dig.* 2011 Dec;24(4):277-81.
52. Dahlstrand HM, Lindquist D, Björnestrål L, Ohlsson A, Dalianis T, Munck-Wikland E, *et al.* P16(INK4a) correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar

carcinoma. *Anticancer Res.* 2005;25(6C):4375-83.

53. Fuste V, del Pino M, Perez A, Garcia A, Torne A, Pahisa J, *et al.* Primary squamous cell carcinoma of the vagina: human papillomavirus detection, p16(INK4A) overexpression and clinicopathological correlations. *Histopathology.* 2010 Dec;57(6):907-16.

54. Choschzick M, Hantaredja W, Tennstedt P, Giesecking F, Wölber L, Simon R. Role of TP53 mutations in vulvar carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 Sep;30(5):497-504.

55. McConnell DT, Miller ID, Parkin DE, Murray GI. p53 protein expression in a population-based series of primary vulval squamous cell carcinoma and immediate adjacent field change. *Gynecol Oncol.* 1997 Dec;67(3):248-54.

56. Kosary CL. FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. *Semin Surg Oncol.* 1994 Feb;10(1):31-46.

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

58. Hecking T, Thiesler T, Schiller C, Lunkenheimer J-M, Ayub TH, Rohr A, *et al.* Tumoral PD-L1 expression defines a subgroup of poor-prognosis vulvar carcinomas with non-viral etiology. *Oncotarget.* 2017 Nov;8(54):92890-903.

59. Mezache L, Paniccia B, Nyinawabera A, Nuovo GJ. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. *Mod Pathol.* 2015 Dec;28(12):1594-602.

60. Borella F, Preti M, Bertero L, Collemi G, Castellano I, Cassoni P, *et al.* Is there a place for immune checkpoint inhibitors in vulvar neoplasms? A state of the art review. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec;22(1):190.

3. OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar aspectos clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos nos casos de carcinoma escamoso de vulva analisados.

ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar na amostra aspectos clínicos como idade; tipo de lesão vulvoscópica; impressão diagnóstica vulvoscópica; tamanho da lesão; quantidade de lesões e localização destas na vulva.
- b) Avaliar aspectos histopatológicos como infiltrado inflamatório; espessura do tumor na amostra analisada; presença ou não de ulceração; presença ou não de invasão linfática e aspecto histológico.
- c) Avaliar a presença de casos positivos e negativos para os marcadores p16, p53 e PD-L1.
- d) Verificar se há correlação entre os marcadores imunohistoquímicos.
- e) Verificar se há correlação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a presença do marcador imunohistoquímico PD-L1.
- f) Verificar se há correlação entre espessura de invasão tumoral e marcadores imunohistoquímicos.
- g) Verificar se há correlação entre invasão linfática e os marcadores imunohistoquímicos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

“Clinical, histopathological and immunohistochemical analysis of vulvar squamous cell carcinoma”

Lorenza Bridi Todeschini¹, Rita de Cássia Sant’anna Alves², Adriana VialRoehe³

¹ MD, Programa de Pós-Graduação em Patologia UFCSPA

² MD, PhD, Departamento de Patologia e Medicina Legal UFCSPA

³ MD, PhD, Departamento de Patologia e Medicina Legal UFCSPA e Programa de Pós Graduação Patologia UFCSPA

Enviado para publicação na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Clinical, histopathological and immunohistochemical analysis of vulvar squamous cell carcinoma

Análise Clínica, Histopatológica e Imunohistoquímica do Carcinoma de Células Escamosas da Vulva

Resumo

Introdução: Um aumento na incidência do carcinoma de células escamosas (CEC) de vulva em mulheres mais jovens tem sido relatado. O CEC de vulva relacionado ao papilomavírus humano (HPV) apresenta expressão de p16 e está associado a melhor prognóstico. Alterações na expressão de p53 e PDL1 estão presentes no CEC não associado ao HPV.

Objetivos: Avaliar correlação entre os marcadores imunohistoquímicos p16, p53 e PDL1 no CEC de vulva e sua relação com características clínico-patológicas.

Material e métodos: Foi realizada revisão de 41 casos de CEC de vulva, coletados entre 2016 e 2021. Em seguida, foram realizadas reações imunohistoquímicas com os marcadores p16, p53 e PDL1. O resultado foi correlacionado com as características clínico-patológicas.

Resultados: A média de idade das pacientes foi de 72,1 anos. O p16 foi positivo em 24,4% dos casos, e o PDL1 foi positivo em 17,1%. O p53 estava ausente em 19,5% das amostras e superexpresso em 24,4% dos casos. Casos positivos para p16 apresentaram menor profundidade de invasão tumoral do que os negativos ($p=0.014$). A média da profundidade de invasão foi maior nos casos com expressão anormal do p53 ($p=0.041$). Houve uma tendência de maior expressão do PDL1 nos casos com infiltrado inflamatório acentuado ($p=0.055$).

Conclusões: Em relação à incidência do CEC, não foi observada alteração na faixa etária das pacientes. Houve correlação inversa entre expressão anormal de p53 e presença do p16. Casos com maior profundidade de invasão tumoral apresentaram expressão anormal de p53 e ausência de p16.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas da vulva, imunohistoquímica, p16, p53, PDL1.

Abstract

Objectives:

The average age of patients with vulvar squamous cell carcinoma (SCC) has been reported to have declined. Human papilloma virus (HPV)-related lesions have been shown to be associated with the expression of the immunohistochemical (IHC) marker p16. Non-HPV-related tumors have been characterized by abnormal p53 and PDL1 expression. We aimed to evaluate the correlation between these markers and vulvar SCC and relate it to the clinical and pathological characteristics.

Materials and methods: Histopathologic assessments and IHC analyses of p16, p53, and PDL1 were performed in 41 samples of vulvar SCC collected between 2016 and 2021. The data were correlated with clinical and pathological characteristics.

Results: The average age of the patients was 72.1 years. Positive p16 and PDL1 staining was detected in 24.4% and 17.1% of the samples, respectively. p53 expression was negative in 19.5% of the samples, whereas it was overexpressed in 24.4%. p16 positive tumors showed a smaller depth of invasion (DOI) ($p = 0.014$), whereas tumors with abnormal p53 expression showed greater DOI ($p = 0.041$). PDL1 expression was correlated with increased inflammatory cells ($p = 0.055$). In addition, lesions with lymphovascular space invasion were p16-negative.

Conclusions: Regarding to the SCC incidence the patients' average age did not change. The expression of p16 was inversely correlated with p53. Tumors with abnormal p53 and absence of p16 showed a greater DOI. Our data suggest an association between PDL1 expression and increased inflammatory infiltrates in vulvar SCC.

Keywords: vulvar squamous cell carcinoma, immunohistochemistry, p16, p53, PDL1

Introduction

Vulvar cancer is a rare entity, responsible for approximately 4-5% of gynecological cancers and less than 1% of the total of cancers in women.⁽¹⁻³⁾ In the last four decades, an increase in the incidence of vulvar squamous cell carcinoma (SCC) has been reported in younger women. Kang et al. have evaluated 20 years of data from 13 high-income countries and observed a 14% increase in the incidence of vulvar cancer. The overall increase was greater in patients aged < 60 years.⁽⁴⁾ The 2021 edition of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Cancer Report associated the decline in the average age of SCC incidence with an increase in human papilloma virus (HPV) infections, a precursor of vulvar cancer.^(1-3,5)

Recent studies have shown that HPV-related vulvar SCC has a better prognosis compared to HPV-unrelated cases.⁽⁶⁻⁹⁾ SCCs HPV-unrelated tend to have more aggressive behavior and worse prognosis.⁽¹⁰⁾ However, morphology alone does not allow an accurate differentiation between the two subtypes, and HPV-related cases can be identified based on the expression of the IHC marker p16.^(9,11,12)

Abnormal p53 expression is present in approximately two-thirds of vulvar cancers HPV-unrelated.^(11,13,14) The mutation pattern of p53 indicates the importance of oxidative stress

in the etiopathology of vulvar carcinogenesis, for example, in cases related to lichen sclerosis.⁽¹⁵⁾

Programmed Death Ligand 1 (PDL1) helps the tumor cells to escape the immune system detection by binding to the Programmed Cell Death 1 (PD1), a cell death receptor expressed on T lymphocytes. PD1/PDL1 negatively regulates the proliferation and function of T lymphocytes, allowing the tumor to remain undetected by the immune system.^(16,17) In vulvar SCC, PDL1 expression occurs more frequently in HPV-negative patients.⁽¹⁶⁾ Patients with vulvar carcinomas with high PDL1 expression have a higher risk of disease recurrence and mortality.⁽¹⁸⁾ Blocking the PD1/PDL1 interaction offers an alternative immunotherapeutic strategy, and patients with accentuated inflammatory infiltrate in the tumor appear to respond better to this treatment. ⁽¹⁹⁻²²⁾

Studies addressing the etiology and age-associated incidence pattern of vulvar cancer in the Brazil are limited. Therefore, the evaluation of the patients' profile may help to establish prognostic and predictive criteria for SCC patients. In this study, we aimed to evaluate the clinical and pathological aspects of vulvar SCC to identify possible correlations with potential clinical implications.

Material and methods

Design and sampling: A cross-sectional study was conducted using a database of videovulvoscopic images (Defferrari SDI®, Novo Hamburgo, BR) and histological samples from biopsies of lesions diagnosed as vulvar SCC from 41 patients. Videovulvoscopy and histological analyses were performed between January 2016 and December 2021 at the Citoclin Laboratory (Porto Alegre, BR). A total of 28 samples were collected in the laboratory and 13 samples were collected at state hospitals, and later sent to the Citoclin Laboratory for histopathological analysis. Patients whose biopsies were collected at other institutions and sent for laboratory analysis did not have a vulvoscopic image for correlation.

Inclusion Criteria: Were included in the study patients with age \geq 18 years old with anatomopathological diagnosis of SCC.

Exclusion criteria: Patients whose biopsy material was scarce were excluded from the study.

Ethical aspects: The project was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (CEP - UFCSPA - Protocol number: 3.084.049). The Ethics Committee waived the need of informed consent.

Clinical analysis: Videovulvoscopy was performed with image magnification using a videocolposcope (Eledmed® Porto Alegre, BR) after application of 5% acetic acid. The images were analyzed by two colposcopists qualified for colposcopy and analysis of lower genital tract pathology. The dermatological characteristics of the lesion, anatomical location, number of lesions, approximate size in centimeters (cm), and diagnostic impression of the lesion were evaluated.

Histopathological analysis: Hematoxylin and eosin (HE) stained slides of the samples were reviewed by two pathologists. Histopathological analysis confirmed the histological type, deep tumoral invasion (DOI) in the biopsy specimen, presence of ulceration and lymphovascular invasion. Inflammatory infiltrate was classified as mild, moderate, or severe. All the analyses were conducted in the Pathology Laboratory at UFCSPA.

IHC analysis: IHC analysis of p16 was carried out on the automated Roche Ventana platform with the ready-to-use mouse monoclonal anti-p16 antibody clone E6H4 (Roche®Arizona, USA). p16 positive status was determined based on brown staining of at least 70% of the tumor, including the cell nucleus, according to the criteria of the American College of Pathology.⁽²³⁾

Immunostaining for p53 was performed manually using mouse monoclonal anti-p53 antibody (catalog number m7001, dilution 1:1000, Dako®Carpinteria, USA). p53 expression was considered to be abnormal when there was a complete absence of staining or when $\geq 50\%$ of the tumor cells showed nuclear staining.⁽²⁴⁾

PDL1 immunostaining was performed manually using an anti-PDL1 antibody (catalog number ACR3171C, dilution 1:150, Biocare® Concord, USA). Positive expression was defined as any extent of membranous staining in $\geq 1\%$ of the tumor cells.⁽¹⁸⁾

Statistical analysis: Categorical data are presented as absolute frequencies and percentages. Quantitative data are presented as mean and standard deviation. Normality was assessed by Shapiro-Wilk test. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare the DOI and lesion size with IHC markers. Student's t-test and ANOVA were used for age analysis. Other associations were verified using Fisher's Exact and Chi-Square tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Analyses were performed using SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp., USA).

Results

A total of 41 cases of vulvar SCC were analyzed, of which 28 had videovulvoscopic images available for correlation.

The average age of the patients was 72.1 years (range: 45–90 years old). Of the 28 cases that had videovulvoscopic images available, 20(71.4%) were Caucasian and 8 (28.6%) were black. In these 28 cases, most lesions were located in left labia majora ($n=9$, 29%), followed by right labia minora ($n=7$, 22.6%), and vaginal introitus ($n=7$, 22.6%). Most patients had only one lesion ($n=25$, 89.3%). Three (20.7%) patients had two concomitant SCC lesions. The most frequent lesion type was vegetative/exophytic 16 (51.6%), followed by friable lesion 11 (35.5%). The average size of the vulvoscopic lesions were 2.5 cm (range: 0.4–5 cm). The diagnostic impression of videovulvscopy examiners was accurate in 18 (69.2%) of the cases (Table 1 and 2).

Table 1. Pathological and immunohistochemical characteristics of the cases.

		n	% Valid	Mean	SD*	Median
Age (n = 41)				72.1	12.5	71.0
Type of SCC (n = 41)	Keratinized	31	75.6%			
	Keratinized and verrucous "Warty"	3	7.3%			
		1	2.4%			
	Keratinized and ulcerated	3	7.3%			
	Keratinized and basaloid	3	7.3%			
Ulceration (n = 41)	Yes	20	48.8%			
	No	21	51.2%			
Inflammatory infiltrated (n = 41)	Mild	19	46.3%			
	Moderated	19	46.3%			
	Accentuated	3**	7.3%			
Lymphovascular space invasion (n = 41)	Yes	2	4.9%			
	No	39	95.1%			
Depth tumor invasion (mm) (n = 41)				1.6	(0-5-6.2)	
p16 (n = 41)	Positive	10	24.4%			
	Negative	31	75.6%			
p53 (n = 41)	0%	8	19.5%			
	1%-9%	3	7.3%			
	10%-24%	13	31.7%			
	25%-49%	7	17.1%			
	>=50%	10	24.4%			
PDL1 (n=41)	Positive	7	17.1%			
	Negative	34	82.9%			

* SD- Standard deviation

** Two of those were PDL1 positive(p = 0.055).

Table 2. Vulvoscopy characteristics

		n	% Valid	Mean	SD*	Median
Skin color (n = 28)	White	20	71.4%			
	Black	8	28.6%			
Diagnostic impression on vulvoscopy (n = 26)**	SCC	18	69.2%			
	HPV	1	3.8%			
	VIN	6	23.1%			
	Other	1	3.8%			
Vulvoscopy characteristics of the lesions (n = 31)***						
Size of the lesion (cm)				2.5	1.4	2.5
Location	Right labia minora	7	22.6%			
	Left labia minora	4	12.9%			
	Right labia majora	4	12.9%			
	Left labia majora	9	29.0%			
	Vaginal Introitus	7	22.6%			
	Perianal	1	3.2%			
	Perineum	3	9.7%			
	Clitoris	3	9.7%			
Type of lesion	Ulceration	8	25.8%			
	Keratosi	6	19.4%			
	Vegetative/exophytic	16	51.6%			
	Pigmented	2	6.5%			
	Papulous	1	3.2%			
	Lichenoid	4	12.9%			
	Friable	11	35.5%			
	Grainy	2	6.5%			
	Achromia	3	9.7%			
	Polypoid	1	3.2%			
	Warty	1	3.2%			
	Acetowhite epithelium	3	9.7%			
	Signs of necrosis	3	9.7%			
	Atypical vessels	4	12.9%			
	Nodular	1	3.2%			
	Erosion	1	3.2%			
	Number of lesions in each patient in vulvoscopy (n = 28)	One	25	89.3%		
Two		3	10.7%			

* SD- Standard deviation, ** 2 of the cases did not have diagnostic impression, ***n = 31 because three patients had two lesions each, plus 25 patients with one lesion each

With regard to the anatomopathological aspects, keratinized SCC was the most frequent histological type 31 (75.6%). Ulceration was present in approximately 20 (48.8%) of the cases. Inflammatory infiltrate was mild in 19 (46.3%), moderate in 19 (46.3%), and accentuated in 3 (7.3%) of cases. The mean DOI was of 1.6 mm (range: 0.5–6.2 mm). Lymphovascular space invasion was observed in 2 (5%) of the cases.

Considering the IHC markers, p16 was positive in 10 (24.4%) and PDL1 was positive in 7 (17.1%) of the patients. p53 was abnormal in 18 (43.9%) cases: absent in 8 (19.5%) and overexpressed in 10 (24.4%) of the cases. The expression of p16 and p53 were inversely correlated: p16-positive cases had a normal expression of p53; p16-negative cases, presented abnormal p53 expression ($p = 0.025$).

There was no significant correlation between PDL1 and p16 expression, nor PDL1 and p53 expression.

Table 3. Correlation between expression of immunohistochemical markers p16, p53, and PDL1, and deep tumor invasion in biopsy samples of vulvar SCC (n = 41)*.

		Deep tumor invasion in the biopsy sample (mm)			p
		Mean	SD**	Median	
p16	Positive	1.1	0.4	1.2	0.014
	Negative	1.8	1.0	1.5	
p53	1%-49%	1.4	0.6	1.3	0.041
	0% or >=50%	1.9	1.2	1.6	
PDL1	Positive	2.2	1.9	1.4	0.578
	Negative	1.5	0.6	1.5	

Eu deletaria essa coluna da Mediana, pq estas usando a média para os cálculos. Essa tabela e as outras tb estão formatadas de um jeito estranho. Pode tirar essas áreas cinzas e colocar no formato científico: sem as laterais. Aliás, eu tiraria as medianas de todas as tabelas (eu deletei da descrição estatística tb).

* Student's *t*-test and analysis of variance were used for age x markers. The Mann-Whitney's and Kruskal-Wallis tests were used to determine the correlation between depth of tumoral invasion in the biopsy sample x markers, as normality was not observed in the Shapiro-Wilk test.

** Standard deviation

The average DOI was 1.1mm in p16-positive cases *versus* 1.8mm in p16-negative ones ($p = 0.014$). In cases with abnormal p53 expression, the mean DOI was 1.9mm, *versus* 1.4mm in the group with normal p53 expression ($p = 0.041$). (Table 3).

Regarding to the inflammatory infiltrate, the majority of those with accentuated inflammatory cells (2 from 3 cases) were PDL1-positive ($p = 0.055$).

Lymphovascular space invasion was observed only in 2 cases: both were p16- negative, and one was PDL1-positive with abnormal p53 expression.

Discussion

This study was designed to evaluate the clinical, histological, and immunohistochemical profiles of patients with vulvar SCC in southern Brazil over a six-year period. The profile of our patients was mostly composed by older patients (mean age of 72.1 years old), with abnormal p53 expression and a mean DOI of 1.6mm. The lymphovascular space invasion was not frequent.

In contrast to previous reports, we did not find a decline in the mean age of patients with vulvar SCC.⁽¹⁻⁵⁾ Four patients were under 60 years of age: 3 of them aged over 50 years, and only 1 patient was 45 years old patient with a previous history of vaginal high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) caused by HPV.

In terms of lesions' location, most of them occurred in the labia majora and minora, which is consistent with a previous report.⁽³⁾

The histopathological analysis showed no correlation with IHC markers, indicating that their morphology is not pathognomonic of vulvar SCC etiology.⁽¹²⁾ In our samples, 25.8% of keratinized SCC were p16-positive, suggesting an HPV correlation, despite the anatomopathological aspect.

In our study the frequency of cases with an abnormal p53 expression (44%) was higher than p16 positivity (24%). It suggests, in contrast to previous reports, that the most common etiology of vulvar SCC in our sample was not HPV-related.⁽¹⁻³⁾ We also observed an inverse correlation between p53 and p16 expressions, demonstrating that, although the HPV carcinogenic pathway is known to affect p53, this is not very frequent in vulvar SCC.⁽¹³⁾ In terms of the DOI in the biopsy specimens, we found interesting data. The average DOI was 1.1 mm in p16-positive cases and 1.9 mm in cases with abnormal p53, inferring that the DOI tend to be greater in vulvar SCCs not HPV-related. It is important to point out that evaluation of the DOI can be challenging in biopsy specimens, especially when it is less than 1 mm, because of the possibility of underestimating the actual DOI.^(25,26) However, in cases where the DOI is >1 mm, it would be helpful in accurately approaching the inguinal lymph nodes. In our samples, the mean DOI was 1.6 mm, which suggests that in most cases the patients' inguinal lymph node compartment would need to be evaluated.

We found no association between lymphovascular space invasion and p16 expression. However, only two cases presented invasion in our cohort. Both cases were p16-negative, one of them was PDL1-positive and another one had p53 abnormal expression. It should be considered that the small number of cases evaluated could affect these data correlation.

Previous studies suggest that the presence of inflammatory infiltrates may be related with a better prognosis, since it is a sign of immune response.^(22,27) In our samples, there was

an association of PDL1 expression and more accentuated inflammatory infiltrate. This may be predictive of better response to immunotherapies targeted at blocking the PD1/PDL1 interaction. ⁽²¹⁾

The main limitations of our study are the sample size and the fact that the histological analysis was performed in punch biopsies specimens, without correlation with the final anatomopathological analysis. However, we should ponder the scarcity of vulvar SCC *per se* and of the studies about it. Despite these limitations, we believe that this study brings valuable information to the clinical, histological, and immunohistochemical profile of patients with vulvar SCC in Southern Brazil.

Conclusion

Our study population did not show a reduction in the mean age of vulvar SCC patients, considering the classical age of the onset of the malignancy (usually ≥ 60 years old). Most vulvar SCC cases in the study were not HPV-related. These two findings suggest that vulvar SCC etiology pattern did not change in our sample.

We identified an inverse association between abnormal p53 and p16 expression, and a direct relation between a higher DOI and an abnormal p53 expression.

It was observed an association of PDL1 expression and the presence of accentuated inflammatory infiltrate.

Further studies with larger sample size and follow up of the patients would help to elucidate the clinic and pathological profile in vulvar SCC and their prognostic impact.

Bibliography

1. Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-2007-a nationwide population-based study. *Gynecol Oncol*. 2011 Jul;122(1):45–9.
2. Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer Causes Control*. 2009 Nov;20(9):1779–82.
3. Olawaiye AB, Cuello MA, Rogers LJ. Cancer of the vulva: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. 2021 Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):7–18.
4. Kang Y-J, Smith M, Barlow E, Coffey K, Hacker N, Canfell K. Vulvar cancer in high-income countries: Increasing burden of disease. *Int J Cancer*. 2017 Dec 1;141(11):2174–86.
5. Xiao X, Meng Y-B, Bai P, Zou J, Zhang Y, Nguyen TMB, et al. Vulvar cancer in china: epidemiological features and risk analysis. *J Cancer*. 2017 Aug 25;8(15):2950–8.
6. Rasmussen CL, Sand FL, Hoffmann Frederiksen M, Kaae Andersen K, Kjaer SK. Does HPV status influence survival after vulvar cancer? *Int J Cancer*. 2018 Mar 15;142(6):1158–65.
7. Proctor L, Hoang L, Moore J, Thompson E, Leung S, Natesan D, et al. Association of human papilloma virus status and response to radiotherapy in vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2020 Jan;30(1):100–6.
8. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Feb 20;100(4):261–9.
9. Alos L, Moyano S, Nadal A, Alobid I, Blanch JL, Ayala E, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer*. 2009 Jun 15;115(12):2701–9.
10. McAlpine JN, Leung SCY, Cheng A, Miller D, Talhouk A, Gilks CB, et al. Human papillomavirus (HPV)-independent vulvar squamous cell carcinoma has a worse prognosis than HPV-associated disease: a retrospective cohort study. *Histopathology*. 2017 Aug;71(2):238–46.
11. Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suárez H, et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006 Nov;30(11):1347–56.
12. Cheng AS, Karnezis AN, Jordan S, Singh N, McAlpine JN, Gilks CB. p16 Immunostaining Allows for Accurate Subclassification of Vulvar Squamous Cell Carcinoma Into HPV-Associated and HPV-Independent Cases. *Int J Gynecol Pathol*. 2016 Jul;35(4):385–93.
13. Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, Hermans J, Trimpos JB, Fleuren GJ. p53 protein overexpression is common and independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer*. 1997 Oct 1;80(7):1228–

- 33.
14. Rakislova N, Clavero O, Alemany L, Saco A, Quirós B, Lloveras B, et al. "Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: A study of 1,594 cases". *Int J Cancer*. 2017 Dec 15;141(12):2517–27.
15. Choschzick M, Hantaredja W, Tennstedt P, Giesecking F, Wölber L, Simon R. Role of TP53 mutations in vulvar carcinomas. *Int J GynecolPathol*. 2011 Sep;30(5):497–504.
16. Hecking T, Thiesler T, Schiller C, Lunkenheimer J-M, Ayub TH, Rohr A, et al. Tumoral PD-L1 expression defines a subgroup of poor-prognosis vulvar carcinomas with non-viral etiology. *Oncotarget*. 2017 Nov 3;8(54):92890–903.
17. Howitt BE, Sun HH, Roemer MGM, Kelley A, Chapuy B, Aviki E, et al. Genetic Basis for PD-L1 Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Cervix and Vulva. *JAMA Oncol*. 2016 Apr;2(4):518–22.
18. Cocks M, Chaux A, Jenson EG, Miller JA, Rodriguez Pena MDC, Tregnago AC, et al. Immune checkpoint status and tumor microenvironment in vulvar squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2020 Jul;477(1):93–102.
19. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1757–66.
20. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Aug;23:32–8.
21. Liu C, Zheng S, Jin R, Wang X, Wang F, Zang R, et al. The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity. *Cancer Lett*. 2020 Feb 1;470:95–105.
22. Price JH, Heath AB, Sunter JP, Sinha DP, Monaghan JM. Inflammatory cell infiltration and survival in squamous cell carcinoma of the vulva. *Br J ObstetGynaecol*. 1988 Aug;95(8):808–13.
23. Abi-Raad R, Prasad ML, Gilani S, Garritano J, Barlow D, Cai G, et al. Quantitative assessment of p16 expression in FNA specimens from head and neck squamous cell carcinoma and correlation with HPV status. *Cancer Cytopathol*. 2021 May;129(5):394–404.
24. Tessier-Cloutier B, Kortekaas KE, Thompson E, Pors J, Chen J, Ho J, et al. Major p53 immunohistochemical patterns in in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod Pathol*. 2020 Aug;33(8):1595–605.
25. Pahmeyer C, Thangarajah F, Ratiu D, Schultheis AM, Schömig-Markiefka B, Mallmann P, et al. Preoperative biopsies as predictor for the necessity of inguinal lymph node surgery in squamous cell carcinoma of the vulva—a retrospective tertiary center analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Oct;146(10):2709–12.
26. Pouwer A-FW, Bult P, Otte I, van der Brand M, van der Horst J, Harterink

LJV, et al. Measuring the depth of invasion in vulvar squamous cell carcinoma: interobserver agreement and pitfalls. *Histopathology*. 2019 Sep;75(3):413–20.

27. Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrão F, Villa LL. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecol Oncol*. 1999 Jul;74(1):61–7.

5. CONCLUSÕES

De acordo com o que nos propusemos a analisar nesta pesquisa, não encontramos na amostra analisada uma média de idade menor do que a classicamente demonstrada (acima dos 60 anos de idade). Assim, não confirmamos a tendência de redução de faixa etária em nossa população, como tem sido visto em trabalhos mais recentes.

Podemos verificar uma relação inversa entre a expressão alterada do p53 (seja completamente ausente, seja expressa em mais de 50% das células tumorais) e a ausência de expressão do marcador p16. Tal fato está alinhado ao perfil etário de nossa amostra, uma vez que a alteração do p53 é comumente relacionada a casos não ligados à via do HPV, que ocorrem em mulheres acima dos 60 anos.

Também demonstramos correlação entre uma maior profundidade de invasão tumoral na amostra e a expressão anormal do p53, assim como uma correlação entre menor profundidade e a expressão do p16. Em nossa amostra, a invasão média foi de 1,6 mm, ultrapassando o ponto de corte de 1 mm, que determina indicação de estudo linfonodal.

Notou-se uma tendência da expressão do marcador PDL1 aparecer relacionada a maior infiltrado inflamatório.

Quanto à invasão linfática, em nenhum dos casos analisados havia a presença do p16 associado. Tal achado pode estar relacionado à possibilidade de melhor prognóstico associado ao CEC de vulva que surge através da via do HPV, conforme visto na literatura. Todavia, em nossa amostra, apenas dois

casos possuíam invasão linfática, e deve ser considerado o pequeno contingente desse grupo amostral.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visa iniciar uma avaliação a respeito do perfil epidemiológico do carcinoma de vulva em um grupo populacional do sul do Brasil.

O laboratório que recebeu as amostras para análise é referência em anatomia patológica no estado do Rio Grande do Sul e recebe cerca de 36 mil casos por ano para análise – destas, cerca de 800 são lesões vulvares, advindas de diversas cidades.

Uma das limitações do trabalho é a pequena amostra analisada. No entanto, deve ser considerada a baixa frequência do câncer de vulva na população.

A continuidade desta análise e sua ampliação também para o perfil epidemiológico de lesões precursoras tumorais (NIVs) pode auxiliar na melhor compreensão do desenvolvimento do câncer de vulva; fornecer um melhor embasamento para sua prevenção e tratamento, e contribuir na análise do prognóstico da doença.

APÊNDICE A – Instrumento de coleta de dados da vulvoscopia anatomopatologia e imunohistoquímica

Número de registro do AP:	
Número de registro do caso:	
Data da coleta:	
Exames prévios:	
Nome:	
Idade:	
Cor da pele:	
Vulvoscopia	
Número de lesões:	Localização: Pequeno lábio esquerdo() Clitóris () Pequeno lábio direito() Inguinal () Grande lábio esquerdo () Perineal () Grande lábio direito () Região pubiana () Intróito vaginal () Desconhecido() Perianal ()
Características clínicas:	
Ulceração () Pigmentada () Papular () Granular () Friável () Ceratótica/placa leucoplásica () Espessamento epitelial () Liquenóide () Verrucosa () Exofítica () Polipóide () Acromia () Hiperchromia () Epitélio acetobranco () Necrose () Vasos atípicos () Nodular () Erosão () Desconhecido ()	
Tamanho (cm):	
Impressão diagnóstica:	
Câncer ()	
Líquen escleroso ()	
HPV ()	
NIV/HSIL ()	
Ceratose ()	
Outros ()	
Desconhecido ()	

<p>Anatomopatológico (AP):</p> <p>CEC queratinizado usual () CEC queratinizado usual e verrucoso () CEC queratinizado usual “warto” () CEC queratinizado usual e ulcerado () CEC queratinizado usual e basalóide ()</p> <p>Espessura da invasão tumoral na amostra da biópsia (mm):</p> <p>Presença de ulceração no AP: Sim () Não ()</p> <p>Infiltrado inflamatório: Leve () Moderado () Acentuado ()</p> <p>Invasão linfática: Sim () Não ()</p> <p>Comentários:</p> <p>NIV/HSIL prévia conhecida: Sim () Não ()</p> <p>Marcadores imunohistoquímicos</p> <p>p16 () p53 () PD-L1 ()</p> <p>Tem imagens vulvoscópicas: Sim () Não ()</p> <p>Comentários:</p>
--

Apêndice 2: Passos da preparação das lâminas para análise imunohistoquímica.

1. Seções de 3 micra nas peças em micrótoino rotatório (LEICA RT 2150), fixação com formalina a 10% e embebimento em parafina;
2. Montagem em lâminas de vidro revestidas com silano (3-aminopropilsilano);
3. Lâminas desparafinizadas em forno histológico (De LEO®) a uma temperatura de 60 graus celsius por 30 minutos.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação Clínico-patológica e Imuno-histoquímica de Lesões Precursoras e Neoplasias Anogenitais.

Pesquisador: Rita de Cassia Sant'Anna Alves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02362818.3.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.084.049

Apresentação do Projeto:

As neoplasias e lesões precursoras da região anogenital são frequentemente associadas à infecção pelo HPV, podendo também apresentar outros fatores etiológicos no seu desenvolvimento. A sua incidência têm aumentado significativamente em pessoas jovens, demonstrando uma mudança no perfil epidemiológico. No colo uterino estas lesões são mais estudadas, contudo nas outras regiões anatômicas existem poucos estudos. Nas últimas classificações de neoplasias a associação com os fatores etiológicos vem ganhando importância diagnóstica, prognóstica e terapêutica. O objetivo deste estudo é correlacionar os aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos destas neoplasias e lesões precursoras. Trata-se de um estudo retrospectivo transversal, realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, laboratórios CITOCLIN e HISTOLAB de Porto Alegre, no período de janeiro de 2014 a agosto de 2018. As amostras serão obtidas a partir de blocos de parafina de espécimes de biópsias do trato anogenital, fixadas em formol tamponado a 10% e embebidas em parafina. A amostra será constituída de 300 blocos de parafina de pacientes com neoplasias anogenitais. Para análise laboratorial, utilizaremos material embocado em parafina, armazenado nos laboratórios CITOCLIN e HISTOLAB. O processamento técnico será realizado por sistema manual, seguindo os protocolos do Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA. Serão realizados os marcadores imuno-histoquímicos P16, P53 e PDL1. Os achados serão relacionados com o tipo histológico das neoplasias aspectos clínicos e prognósticos.

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

UF: RS

Telefone: (51)3303-8804

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.050-170

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.084.049

Objetivo da Pesquisa:

Geral - Determinar a prevalência de neoplasias intraepiteliais e neoplásicas do trato anogenital e a sua associação com o vírus do HPV através do estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico das lesões. Específicos –

1 – Correlacionar os tipos histológicos das neoplasias intraepiteliais e neoplásicas com os aspectos clínicos e epidemiológicos.

2 – Identificar aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de relevância prognóstica em neoplasias intraepiteliais e neoplásicas do trato anogenital.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O eventual risco é mínimo, uma vez que a coleta de material já foi realizada dentro do fluxo habitual de cuidados de saúde destes pacientes, e diz respeito a questões ligadas ao sigilo e privacidade dos seus dados.

Os benefícios esperados com os resultados desta pesquisa são direcionados para o desenvolvimento da ciência, o que poderá conferir mudanças no tratamento deste tipo de câncer no futuramente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Diante dos ajustes realizadas frente ao relatório do CEP o projeto encontra-se aprovado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos encontram-se adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aceito na atual configuração.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1235142.pdf	30/11/2018 15:21:36		Aceito
Outros	cartarespostaparecer.pdf	30/11/2018 15:21:19	Rita de Cassia Sant'Anna Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	neoplasiasanogenitaisnovo.docx	30/11/2018 15:20:56	Rita de Cassia Sant'Anna Alves	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.084.049

Investigador	neoplasiasanogenitaisnovo.docx	30/11/2018 15:20:56	Rita de Cassia Sant'Anna Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEnovo.docx	30/11/2018 15:20:43	Rita de Cassia Sant'Anna Alves	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	01/11/2018 16:02:55	Adriana Vial Roehé	Aceito
Outros	termodecompromissorelatorios.pdf	29/10/2018 15:28:33	Adriana Vial Roehé	Aceito
Outros	termodeanuencialabdepesquisa.pdf	29/10/2018 15:28:11	Adriana Vial Roehé	Aceito
Outros	termodeanuenciaticoclin.pdf	29/10/2018 15:27:33	Adriana Vial Roehé	Aceito
Outros	termodeanuenciahistolab.pdf	29/10/2018 15:27:09	Adriana Vial Roehé	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 14 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br