

MARCADORES MOLECULARES EM CARCINOMAS DE VULVA ASSOCIADOS AO HPV – ANÁLISE DE p16 E Ki-67: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA, VERA APARECIDA SADDI,
ANDREA ALVES RIBEIRO

Resumo: o câncer de vulva é um tumor raro entre as mulheres. O objetivo do estudo foi realizar uma revisão da literatura verificando a associação dos marcadores moleculares p16 e Ki-67 nos carcinomas vulvares associados à infecção por Papilomavírus humano (HPV). Foram encontradas as proteínas p16 e Ki-67 associadas à infecção pelo HPV pelo método de imunohistoquímica, facilitando o diagnóstico precoce desta neoplasia.

Palavras-Chave: Carcinoma de células escamosas vulvares. Neoplasia intraepitelial vulvar. Papilomavirus humano. P16. Ki-67.

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS VULVARES

O câncer de vulva é um tumor epitelial maligno relativamente raro (RUMBOLD et al., 2012), heterogêneo, caracterizado como Papilomavírus humano (HPV) positivo ou negativo (HAMPL et al., 2006; SHUKLA et al., 2009).

Estes dois tipos diferentes de carcinoma vulvar apresentam diferentes características epidemiológicas, clínicas, patológicas e moleculares, sendo assim considerados como duas classes separadas (PINTO, 2002; DE SAN-JOSÉ et al., 2013; PINO et al., 2013).

Tumores com positividade para HPV têm uma tendência a serem não queratinizados, tumores basalóides ou de verrugas, muitas vezes cercados por Neoplasia Intraepitelial Vulvar (NIV) tipo usual associados com as mulheres mais jovens (HAMPL et al., 2006; KNOPP et al., 2009). Por outro lado, o câncer vulvar com subtipo verrucoso e alguns casos de lesões pré-cancerosas da NIV, não estão associados com a infecção por HPV (SHUKLA et al., 2009). Este tipo é frequentemente encontrado em mulheres mais velhas com

histórico de líquen escleroso classificado como carcinomas de células escamosas queratinizantes, unifocais e mais agressivos (HAMPL et al., 2006).

Nos tumores com diagnóstico positivo para o HPV, dificilmente são encontradas mutações genéticas significativas e ocorrem associações do vírus com outros fatores de risco. De acordo com a etiologia do carcinoma, o status não relacionado intimamente com o vírus envolve tanto a participação genética quanto os fatores inerentes ao hospedeiro (DE SANJOSÉ et al., 2013).

O tipo mais comum de tumor vulvar é o carcinoma de células escamosas (CEV), seguido de melanoma, carcinoma de células basais e adenocarcinoma (WHO, 2010). O tumor vulvar de células escamosas se apresenta composto de células escamosas de diferentes graus de diferenciação e (SUTTON et al., 2008) geralmente é solitário, formando uma pápula ou placa verrucosa hiperqueratótica com sintomatologia semelhante às observadas com NIV (SIDERI et al., 2005). Os carcinomas do tipo basalóide e de verruga surgem a partir da NIV do tipo usual, e são células indiferenciadas lembrando células basais que substituem a espessura de toda a epiderme, que é geralmente plana e não papilar (PINO et al., 2013).

EPIDEMIOLOGIA

O câncer de vulva é raro entre as mulheres em todo o mundo, apresenta maior ocorrência em mulheres pós-menopausadas com aproximadamente 66% dos casos diagnosticados naquelas com idade maior ou igual à 70 anos (WHO, 2010; RUMBOLD et al., 2012; MAGNUSSEN et al., 2013). Diversos estudos revelam ser a quarta neoplasia ginecológica mais comum, com uma estimativa de 27.000 novos casos em 2008 (BRUNI et al., 2014) e incidência de 1,5-2 por 100.000 mulheres por ano (TACHEZY et al., 2011).

Nos Estados Unidos, 3.740 novos casos foram diagnosticados e 880 mortes contabilizadas no ano de 2005 (HAMPL et al., 2006). Para o *National Cancer Institute* (NCI) *Surveillance Epidemiology, and End Results* (SEER), *Cancer Statistics Review* uma estimativa de 3.460 casos de câncer vulvar foram esperados para diagnóstico nos Estados Unidos em 2009 (ZANNONI et al., 2011). A incidência deste câncer situa-se entre 0,5 e 1,5 por 100.000 casos observados em várias populações europeias (Escócia, Dinamarca, Espanha, Itália) (HAMPL et al., 2006; SHUKLA et al., 2009), ao mesmo tempo apresenta baixa incidência na África Sub-Saariana, Sudeste da Ásia e América Latina (DE SANJOSÉ et al., 2013).

O câncer vulvar é cerca de seis vezes menos frequente que o câncer do colo do útero (HAMPL et al., 2006; SHUKLA et al., 2009). Em todo o mundo, cerca de 60% de todos os casos de câncer vulvar ocorrem em países desenvolvidos, indicando o impacto limitado dos programas de rastreio do colo do útero para prevenir cânceres vulvares e vaginais (WHO, 2010). A incidência do CEV no Brasil é uma das mais altas do mundo (PINTO, 2002). Os últimos registros mostram que as capitais de São Paulo (510 casos), Aracajú (10 casos), Cuiabá (12 casos), Fortaleza (17 casos), Belo Horizonte (33 casos) e Goiânia (34 casos) são locais com número significativo de casos diagnosticados entre o período de 2003 e 2007 (BRUNI et al., 2014).

Infecção por Papilomavírus Humano

O HPV é um vírus de DNA, com mais de 189 tipos sequenciados e classificados em baixo e alto risco oncogênico. Apresenta um tropismo para células do epitélio basal, onde o ciclo de vida do vírus está intimamente associado com o processo de diferenciação da célula epitelial hospedeira (MUNGER et al., 2013).

O genoma do HPV é constituído por aproximadamente oito regiões de leitura aberta (*open reading frames-ORF*), composta por pelo menos seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo denominados respectivamente, genes E (*Early*) e genes L (*Late*). A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Dentre esses, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. O gene E5 correlaciona-se com a proliferação celular, e E6 e E7 são os genes envolvidos na transformação celular e carcinogênese (DOORBAR et al., 2012; PERALTA-ZARAGOZA et al., 2013).

As oncoproteínas E6 e E7 são responsáveis pela indução, bem como, a manifestação da transformação fenotípica das células, particularmente pela inativação do controle do ciclo celular e mecanismos de apoptose. Ambas as proteínas, E6 e E7, podem favorecer a multiplicação das células alvo (SNIJDERS et al., 2006; DOORBAR et al., 2012; PERALTA-ZARAGOZA et al., 2013). Este fenômeno ocorre devido à interação dos genes virais com proteínas reguladoras do ciclo, p53 (auxilia no reparo do DNA e apoptose) e a proteína do retinoblastoma - Rb (controla a transição entre fase G1 e S) ocorrendo uma ativação de defeitos na fase mitótica e instabilidade genômica. Quando E6 induz a degradação de p53, tem-se a inibição da expressão de genes envolvidos na apoptose, impedindo uma parada do ciclo celular e levando a célula à imortalização. Seu papel no processo de transformação se dá em união com E7. A oncoproteína E7 nos HPVs de alto risco se liga a proteína Rb permitindo que o substrato da Rb (E2F) ative a progressão do ciclo para a fase S, ocorrendo assim a proliferação celular (PINTO, 2002; WOODMAN et al., 2007; ZAMORA et al., 2009; MUNGER et al., 2013).

O CEV está associado com infecção por HPV em 9 a 57% dos casos e, é aceita como um contribuinte essencial para o desenvolvimento de NIV usual, mostrando uma forte interação do vírus em células e progressão neoplásica (KNOPP et al., 2009). A infecção por HPV de alto risco representa 5% de todos os cânceres humanos (MUNGER et al., 2013), e na maioria das mulheres com tipo basalóide e de verruga no câncer vulvar os tipos 16, 18, 31 e 33 são os tipos de HPV mais frequentemente detectados e os tipos 6 e 11 são mais raros (KOYAMATSU et al., 2003).

Líquen Escleroso

Líquen escleroso é uma desordem inflamatória crônica da pele que acomete a área genital podendo afetar homens e mulheres de qualquer idade. Suas lesões caracterizam-se pela presença de placas esbranquiçadas e degeneração de células basais (PINTO, 2002).

O líquen escleroso na vulva está envolvido com o desenvolvimento do CEV, e em transformações malignas podendo atuar como um precursor para outras doenças genitais como hiperplasia escamosa vulvar (TAYLOR et al., 2007), mas o líquen não é considerado uma condição pré-neoplásica, pois confere somente um risco maior do que esperado para o carcinoma (ROBBINS, 2005).

Sua progressão é desencadeada a partir de fatores imunológicos e predisposição genética, que requer um desenvolvimento de alterações em genes do hospedeiro, acumulando no epitélio escamoso vulvar, ocorrendo o processo de envelhecimento e o desenvolvimento de células atípicas (PINTO, 2002; GUERRERO-SETAS et al., 2013). Uma porcentagem de 3% a 7% das mulheres com líquen escleroso vulvar estão em risco de CEV, podendo converter em carcinoma vulvar em 4 a 6% dos casos (BAYARD et al., 2013).

O tabagismo, como um dos mais importantes fatores comportamentais, foi indicado como um fator de risco para o câncer genital e como um cofator para infecção por HPV nos tumores vulvares (PINTO, 2002).

A presença de nitrosaminas específicas do tabaco no muco do trato genital feminino confirma os questionamentos sobre a influência positiva do tabaco nesses tumores (PINTO, 2002). Variações genéticas nas citocinas Th1, mostram modificações no risco de câncer vulvar para fumantes, onde 67% dos indivíduos com câncer vulvar são tabagistas (RUMBOLD et al., 2012).

A maior parte dos casos de carcinoma de células escamosas queratinizantes é observada em mulheres pós-menopausadas, mostrando a influência de fatores hormonais sobre o desenvolvimento do câncer (ZANNONI et al., 2011). As malignidades epiteliais decorrentes da vulva não são por sensibilidade hormonal, mas os receptores de estrogênio foram vistos com um maior envolvimento com o desenvolvimento do câncer vulvar. Zannoni et al., (2011), mostram em seu estudo que há modificações no tempo e expressão de uma proteína receptora para estrogênio identificando uma transição do epitélio normal a câncer invasivo em pacientes idosos com carcinoma de células escamosas vulvares.

Fatores Prognósticos

Transformações malignas são determinadas a partir de uma sequência de eventos genéticos e epigenéticos, envolvendo alterações no ciclo celular permitindo o crescimento de células transformadas, podendo ocorrer invasão local e metástases (LERMA et al., 2002). A passagem de focos de tumor para além de seu sítio primário é conhecido como metástase (ROBBINS, 2005).

Metástases em câncer ginecológico são comuns, e ocorrem por alcançar um caminho hematológico e ou linfático do organismo (PABUCCU et al., 2012). No entanto, a ocorrência de metástases em carcinomas vulvares não é frequente, constituem 5 a 8% e ocorrem de forma lenta manifestando-se tardiamente (LERMA et al., 2002; PABUCCU et al., 2012). Os fatores de risco mais importantes para ocorrência de metástase envolve o aspecto clínico do nódulo, idade ao diagnóstico, grau de diferenciação, estágio e tamanho do tumor, profundidade de invasão do estroma e presença de invasão do espaço linfocelular (IACOPONI et al., 2013). Diversos estudos definem que o tamanho do tumor, maior

invasão do estroma e da margem livre inferior de excisão são considerados fatores prognósticos de recorrência, mas o fator prognóstico mais importante em CEV é a presença de linfonodos regionais metastáticos (IACOPONI et al., 2013; ARAGONA et al., 2014).

Carcinomas vulvares geralmente apresentam um bom prognóstico quando detectado e tratado em estágios mais precoces. Os critérios que predizem a sobrevida do paciente estão relacionados com o estado dos nódulos inguinais no momento do diagnóstico, sendo que em pacientes onde não houve envolvimento de gânglios a sobrevida chega a 90% (IACOPONI et al., 2013). Os planejamentos terapêuticos são realizados com base nos aspectos relacionados ao hospedeiro, estadiamento seguindo a nomenclatura TNM, metástases, condição dos linfonodos e aspectos moleculares relacionados (INCA, 2004; TRIETSCH et al., 2013).

Estudos objetivando o desenvolvimento de biomarcadores podem auxiliar na distinção de produtos da transformação de infecções por HPV e identificar precocemente a gravidade da doença (ROELENS et al., 2012). Contudo, os tumores vulvares que apresentam positividade para HPV têm sido diagnosticados com melhor prognóstico do que os tumores HPV negativos (HAMPL et al., 2006; KNOPP et al., 2006).

Nas NIVs, bem como os carcinomas adjacentes, a expressão de biomarcadores tem mostrado uma eficiência na identificação das lesões habituais (HOEVENAARS et al., 2008), e são estudados no objetivo de reduzir a incidência mundial desses tumores (HAMPL et al., 2006; OLSEN et al., 2012). Uma quantidade grande de marcadores tem sido implicados na patogênese e progressão do CEV como p16, p21, p14, p27, ciclina A, ciclina D1, p53, VEGF, TGF α , *HER-2* e EGFR. A infecção por HPV e outras proteínas como p16 são vistas contribuindo com informações para garantir o prognóstico do carcinoma (KNOPP et al., 2009).

Dentre os métodos moleculares diagnósticos para a detecção de HPV destacam-se as técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Captura Híbrida e Híbridação *in situ*. São técnicas extremamente sensíveis que utilizando de *primers* ou sondas auxiliam na identificação dos grupos ou tipos do vírus relacionados. Assim como para o DNA do vírus outras técnicas como imunohistoquímica, imunoperoxidase e PCR colaboram na identificação de marcadores moleculares (GRAVITT et al., 2000).

O método de imunohistoquímica é o mais comumente utilizado para identificação de antígenos nos tecidos pesquisados, possibilitando a localização e grau de distribuição de proteínas e biomarcadores que foram expressas pelo organismo. Esse método tem um princípio de ligação específica de anticorpos e antígenos e juntamente com a triagem facilita as opções de tratamento e encontro de resultados (GRAVITT et al., 2000; MOLINA et al., 2004).

MARCADORES MOLECULARES NO CARCINOMA DE VULVA

Proteína P16

A p16 é uma proteína supressora de tumor que pertence à família dos inibidores de quinase dependente de ciclina-INK4, sendo um produto de genes *CDKN2A*

que atua suprimindo a atividade de quinases dependente de ciclina 4 e 6 (CDK 4 e 6) (LERMA et al., 2002; KOO et al., 2013).

Essa proteína é conhecida como um biomarcador para a transformação de infecções por HPV, onde sua expressão aumentada tem sido associada com displasia de células infectadas. Sua superexpressão é resultado do controle fisiológico induzido por inativação funcional de pRb pela ação da proteína E7 de HPV. Uma ciclina (D1) forma um complexo com a quinase dependente de ciclina 4 ou 6 para efetuar a fosforilação de pRb. Quando pRb torna-se fosforilada provoca a libertação do fator de transcrição E2F ativo, induzindo a expressão de genes fazendo com que as células entrem em estágio de proliferação (ZAMORA et al., 2009; ROELENS et al., 2012).

Em células normais, a expressão de p16 é silenciada por fenômenos epigenéticos complexos. Na expressão de p16 em altos níveis têm-se a formação de um excelente marcador biológico para lesões e cânceres associados ao HPV de alto risco, onde a perda de função de pRb e o aumento da expressão de p16 parecem ser acontecimentos precoces na carcinogênese (MUNGER et al., 2013).

A expressão de p16 parece ser associada aos tumores que contêm mutações do pRb em tipos de cânceres não associados ao HPV, incluindo mama, próstata, pulmão e carcinoma de ovário (MUNGER et al., 2013). Nos adenocarcinomas cervicais e adenocarcinomas *in situ* foi visualizado que há uma superexpressão de p16 e que esta apresenta-se fortemente associada com os tipos de HPV 16 ou 18 (RIETHDORF et al., 2004).

A infecção por HPV e a expressão de p16 foi relatada também em histórico de líquen escleroso. Os resultados sugerem que uma fração do líquen escleroso está associada com a infecção por HPV. Não está claro se estes casos estão em risco específico de progressão para o carcinoma de células escamosas vulvares ou se o líquen escleroso e a infecção por HPV simplesmente coexistem (BAYARD et al., 2013).

Proteína Ki-67

Ki-67 é uma proteína de localização nuclear, não-histona expressa durante as fases M, G2, S e final de G1 do ciclo celular, avaliada na determinação da taxa de proliferação celular (ZAMORA et al., 2009). Esta proteína é um eficiente marcador de células proliferativas, tem sido associada com um aumento no grau de displasias cervicais e avaliada como um marcador de prognóstico adicional de câncer cervical (ZAMORA et al., 2009).

O aumento da expressão de Ki-67 também foi identificado em líquen escleroso e carcinoma de células escamosas da vulva, sinalizando esta proteína como marcador útil para lesões pré-malignas e malignas. A expressão de Ki-67 também pode estar relacionada às lesões associadas com a infecção por HPV, no entanto, estas lesões apresentaram diferentes padrões de coloração e localização (BAYARD et al., 2013), podendo ser identificadas pela metodologia de imunohistoquímica (GADDUCCI et al., 2012). Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura em bases de dados nacionais e internacionais investigando a associação dos marcadores moleculares p16 e Ki-67 nos carcinomas de vulva associados à infecção por HPV.

METODOLOGIA

Para a construção da revisão foram realizadas buscas em bases de dados SciELO, PubMed/ Medline e Old Medline, durante o período de 2000 a 2013. Consultas sobre os descritores foram baseados nas listas do MeSH e DeCS. Os seguintes termos em inglês foram selecionados para a realização da busca: *p16 (INK4A)*, *p16INK4 protein*, *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-2A*, *KIAA0067 protein human*, *vulvar Neoplasms*, *Cancer of the Vulva*, *Vulva Cancer*. Em português, foram utilizados os termos p16, Ki-67, câncer de vulva, carcinoma de células escamosas e imunohistoquímica. Os termos foram combinados na busca evitando que artigos fossem omitidos durante a pesquisa eletrônica. A revisão bibliográfica teve como critérios de inclusão a seleção dos artigos de idioma inglês, português e espanhol, pesquisando p16 e ou Ki-67 em carcinoma vulvar, associação do carcinoma vulvar com marcadores moleculares e HPV. Os critérios de exclusão adotados foram os artigos com data de publicação anterior ao ano 2000 e com inadequação da questão estudada. Todas as publicações posteriormente selecionadas foram reavaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada uma seleção de doze estudos dentro do período estipulado entre os anos de 2000 e 2013. Alguns autores se preocuparam em relacionar a presença dessas proteínas com a infecção por HPV entre estudos diferentes, nos quais a maior parte avaliou a proteína p16, utilizando a metodologia de imunohistoquímica. É a técnica mais comumente escolhida devido à facilidade em detecção e diferenciação de antígenos de uma célula classificando-a uma população heterogênea, facilitando a localização de marcadores biológicos para complementar o diagnóstico promovendo um melhor prognóstico.

Dentre os trabalhos levantados, sete estavam relacionados a pesquisas com marcador proteína p16. Destes, seis, testaram as amostras para verificar relação com HPV, e obtiveram resultados satisfatórios, com positividade de HPV de alto risco oncogênico (16 e 33) na maioria dos casos. O número de amostras foi consistente e os casos positivos para p16 variaram de acordo com o tipo de carcinoma vulvar estudado (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos associando a positividade da proteína p16 em carcinomas vulvares

Proteína P16 em Carcinomas Vulvares								
ARTIGO	ANO	N ¹			Total ⁵	HPV ²	METODOLOGIA	
		SCCV ³	N ¹	NIV ⁴				N ¹
Lerma et al	2002	68%	38	69,2%	13	51	NÃO	PCR
Riethdorf et al	2004	98,6%	71	91%	67	138	SIM	Imunohistoquímica
Knopp et al	2006	18,2%	198	68,4%	19	217	SIM	Imunohistoquímica
Hoevenaars et al	2008	2,5%	40	100%	22	62	SIM	Imunohistoquímica
Guerrero-Setas et al	2013	70%	30	0	0	30	SIM	PCR
Lavorato-Rocha et al	2013	28,8%	139	0	0	139	SIM	Imunohistoquímica
De Sanjosé et al	2013	25,1%	1709	0	0	1709	SIM	PCR

Legenda: N1 Número de Casos; HPV2 Papilomavirus humano; SCCV3 Carcinoma de Células Escamosas Vulvares; NIV4 Neoplasia Intraepitelial Vulvar; Total 5 Total de Amostras de cada Estudo.

Diversos autores demonstram que o aumento da expressão da proteína p16 ocorre devido à ativação da oncoproteína E7, que inativa a proteína Rb através de sua associação aumentando E2F (KNOPP et al., 2006). Em neoplasias cervicais observa-se que a expressão da proteína p16 está relacionada à presença de HPV de alto risco (RIETHDORF et al., 2004). Para os carcinomas vulvares parece não ser diferente. Knopp et al., (2006) observaram que a expressão elevada de p16 é significativamente correlacionada com a presença de HPV. Dos tumores HPV positivos, 85% tiveram alta expressão de p16, enquanto que apenas 15% dos tumores de HPV negativos apresentaram tal resultado (Figura 1).

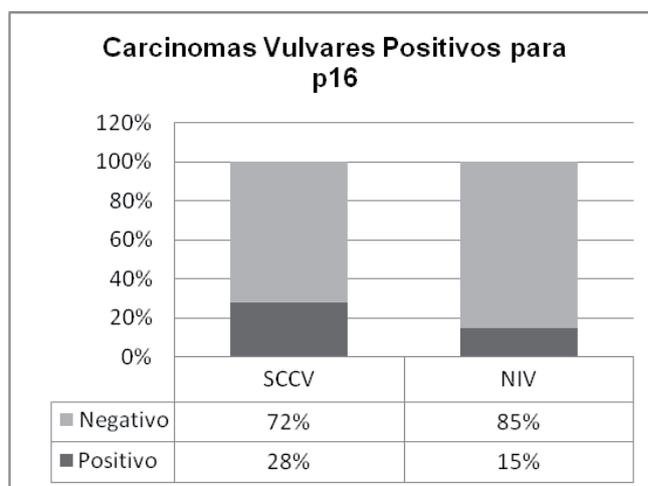


Figura 1: Relação em porcentagem da positividade da proteína p16 nos carcinomas vulvares. Legenda: SCCV - Carcinoma de Células Escamosas Vulvares; NIV - Neoplasia Intraepitelial Vulvar.

O trabalho de Hoevenaars et al., (2008), verificou que todas as lesões intraepiteliais vulvares com infecção por HPV também apresentaram-se positivas para a proteína p16. Esta análise demonstra que semelhante aos casos de lesões cervicais, um aumento na expressão de p16 difusa no epitélio vulvar indica um processo neoplásico relacionadas com HPV de alto risco, independentemente do nível de diferenciação (RIETHDORF et al., 2004).

A proporção de casos positivos para a proteína p16 mostrou-se relacionada com a infecção por HPV. A porcentagem de casos positivos foi vista tanto em amostras de carcinoma de células escamosas quanto em neoplasias intraepiteliais vulvares.

A proteína Ki-67 em carcinomas de vulva foi avaliada por cinco pesquisas, usando metodologia de imunohistoquímica. Poucos estudos foram encontrados para a análise de Ki-67, mas nota-se que houve positividade em sua totalidade em NIV. Dentre os carcinomas vulvares o mais frequentemente estudado foi carcinoma de células escamosas. Os autores avaliaram poucas amostras para investigação em neoplasias intraepiteliais vulvares (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos associando a positividade da proteína Ki-67 em carcinomas vulvares

Proteína Ki-67 em Carcinomas Vulvares								
ARTIGO	ANO	N ¹				Total ⁵	HPV ²	METODOLOGIA
		SCCV ³	N ¹	NIV ⁴	N ¹			
Rolfe et al	2001	100%	1	0	0	1	NÃO	Imunohistoquímica
Brustmann et al	2001	100%	22	100%	26	48	NÃO	Imunohistoquímica
Koyamatsu et al	2002	67,7%	31	0	0	31	SIM	Imunohistoquímica
Taylor et al	2007	100%	9	0	0	9	NÃO	Imunohistoquímica
Zannoni et al	2010	100%	16	100%	13	29	NÃO	Imunohistoquímica

Legenda: N¹ Número de Casos; HPV² Papilomavirus humano; SCCV³ Carcinoma de Células Escamosas Vulvares; NIV⁴ Neoplasia Intraepitelial Vulvar; Total⁵ Total de Amostras de cada Estudo.

Nos cinco estudos avaliados, a expressão de Ki-67 variou de 67,7% a 100%. Nestes estudos, foram encontrados 79 casos de carcinoma de células escamosas vulvares, com uma expressão média de Ki-67 de 87%. A quantidade de 39 casos de neoplasia intraepitelial vulvar foi avaliada, com uma expressão média de Ki-67 de 100% (Figura 2).

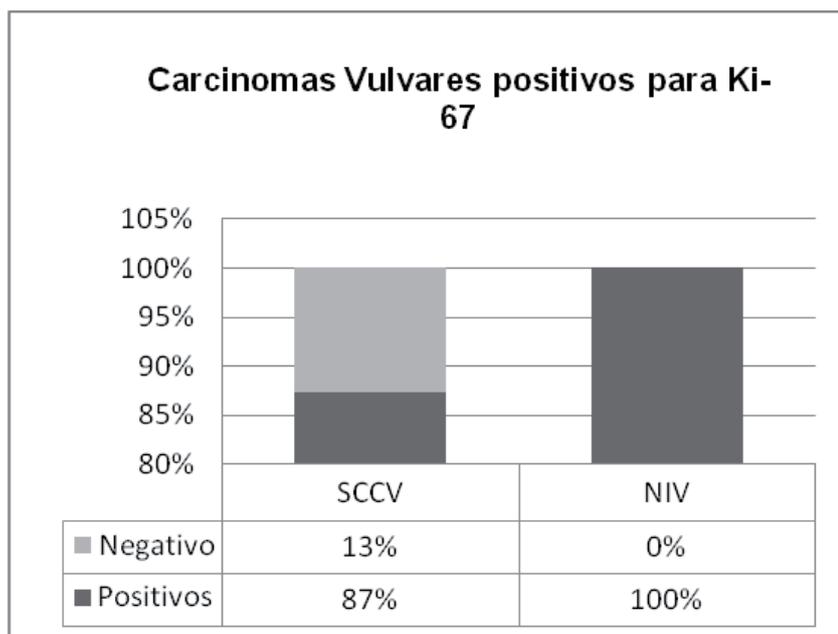


Figura 2: Relação em porcentagem da positividade da proteína Ki-67 nos carcinomas vulvares. Legenda: SCCV - Carcinoma de células Escamosas Vulvares; NIV - Neoplasia Intraepitelial Vulvar.

Zannoni et al., (2011) utilizaram a proteína Ki-67 associada a outras proteínas relataram alta positividade dessa proteína em carcinoma de células escamosas vulvares. Segundo Rolfe et al., (2001), a associação de p53 e Ki-67 indica o desenvolvimento de lesões e carcinomas vulvares malignos além de ser um importante agente na patogênese do carcinoma de células escamosas vulvares. Assim sendo, este marcador, como demonstrado nos resultados, é associado à proliferação celular no epitélio vulvar podendo permitir a caracterização das possíveis alterações ocorridas no epitélio (BRUSTMANN et al., 2002).

Entre os estudos selecionados para avaliação de Ki-67, apenas um dos trabalhos correlacionou a presença de HPV e Ki-67, este encontrou uma porcentagem de 68% entre as amostras de carcinoma de células escamosas com presença dos tipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV 16 e HPV 18) (KOYAMATSU et al., 2002).

Nas pesquisas de Hoevenaars et al., (2008), as amostras de carcinoma associados ao líquen escleroso apresentaram-se negativas para infecção com HPV. Em estudos recentes Guerrero-Setas et al., (2013) demonstraram que uma associação da infecção pelo vírus com líquen escleroso é possível, sendo que 3,7% de suas amostras foram positivas, mas este por apenas um tipo viral, o HPV 66.

A proteína Ki-67 é considerada um antígeno nuclear expresso nas células durante atividade de proliferação (ZANNONI et al., 2011). Sua função exata é desconhecida, mas os pesquisadores tem utilizado a proteína para verificar a quantidade de células em divisão nas neoplasias (BRUSTMANN et al., 2002). Uma vez que a infecção por HPV estimula a divisão celular, sua presença também deve estar associada à infecção por HPV, entretanto, os carcinomas de vagina HPV negativos que apresentam altos índices de proliferação celular também apresentarão aumento da expressão de Ki-67.

Koyamatsu et al., (2002) observaram que o marcador de proliferação celular Ki-67 é raramente relatado em relação a neoplasias vaginais e vulvares. Este dado pode ter sido influenciado a partir do pequeno número de amostras. Por outro lado, em um outro estudo realizado por Rolfe et al., (2001) a positividade para a proteína foi de quase 100%, com maior frequência nos carcinomas de células escamosas vulvares associados ao líquen escleroso. Esta divergência pode ser explicada pela utilização de técnicas metodológicas diferentes, onde cada uma apresenta particularidades de sensibilidade para marcadores moleculares.

CONCLUSÃO

O HPV é um agente etiológico importante no papel da carcinogênese vulvar. Nos estudos analisados a infecção positiva para o vírus foi detectada em 80% dos casos onde a maioria se apresentou em neoplasias intraepiteliais vulvares. O tipo HPV 16 seguido de HPV 33 foram os mais prevalentes.

As proteínas p16 e Ki-67 foram extensamente estudadas, suas funções são dependentes da desregulação celular e a expressão dessas proteínas pode ser perturbada por agentes externos, tais como a infecção por HPV. Dentre os trabalhos selecionados para este estudo sua presença foi encontrada em casos associados ao líquen escleroso, neoplasia intraepitelial vulvar e alguns casos de carcinoma de células escamosas vulvares.

Uma melhor compreensão dos aspectos moleculares desta neoplasia e sua interação biológica com o HPV é fundamental para o reconhecimento do potencial inovador dos marcadores prognósticos. O que ressalta a necessidade da realização de novas pesquisas para elucidar a patogenia do carcinoma vulvar.

MOLECULAR MARKERS IN CANCER OF THE VULVA ASSOCIATED WITH HPV - ANALYSIS p16 AND Ki-67: LITERATURE REVIEW

Abstract: vulvar cancer is a rare tumor among women. The aim of the study was to review the literature verifying the association of molecular markers p16 and Ki-67 in vulvar carcinomas associated with infection by human papillomavirus (HPV). The proteins p16 and Ki-67 associated with HPV infection by immunohistochemistry method were found, facilitating early diagnosis of this neoplasia.

Keywords: Vulvar squamous cell carcinoma. Vulvar intraepithelial neoplasia. Human papillomavirus. P16. Ki-67.

Referências

ARAGONA, A. M. et al., An analysis of reported independent prognostic factors for survival in squamous cell carcinoma of the vulva: Is tumor size significance being underrated? *Gynecologic Oncology*, v. 132, p. 643-648, 2014.

BAYARD, C. C. et al., Protein Markers of Malignant Potential in Penile and Vulvar Lichen Sclerosus. *The Journal of Urology*, v. 190, p. 399-406, 2013.

BRUNI, L. et al., ICO-Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Cen-

- tre). Human Papillomavirus and Related Diseases in World. *Summary Report*, 2014.
- BRUSTMANN, H.; NAUDÉ, S. Expression of Topoisomerase II, Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, p53 and Argyrophilic Nucleolar Organizer regions in vulvar squamous lesions. *Gynecologic oncology*, v. 86, p. 192-199, 2002.
- DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L. et al., The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses, *Vaccine*, v. 30, p. 55-70, 2012.
- GADDUCCI, A. et al., Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva. *Oncology/Hematology*, v. 83, p. 71-83, 2012.
- GRAVITT, P. E. et al., Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 357-361, 2000.
- GROWDON, W. B.; CARMEN, M. D. Human papillomavirus-related gynecologic neoplasms: screening and prevention. *Rev. Obstet. Gynecol.*, 2008.
- GUERRERO-SETAS, D. et al., Differential gene hypermethylation in genital lichen sclerosus and cancer: a comparative study. *Histopathology*, v. 63, p. 659-669, 2013.
- HAMPL, M. et al., Effect of Human Papillomavirus Vaccines on Vulvar, Vaginal and Anal Intraepithelial Lesions and Vulvar Cancer. *Obstet Gynecol*, v. 108, p. 1361-8, 2006.
- HART, W. R. Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *J. Gynecol. Pathol*, v. 20, p. 16-30, 2001.
- HOEVENAARS, B. M. et al., A panel of p16INK4A, MIB1 and p53 proteins can distinguish between the 2 pathways leading to vulvar squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 123, p. 2767-2773, 2008.
- IACOPONI, S. et al., Prognostic factors associated with local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *J. Gynecologic Oncologic*, v. 24, p. 242-248, 2013.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). TNM – Classificação de Tumores Malignos. Disponível em: <www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2014.
- INSINGA, R. P. et al., A Systematic Review of the Prevalence and Attribution of Human Papillomavirus Types Among Cervical, Vaginal and Vulvar Pre-cancers and Cancers in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, v. 17, p. 1611-1622, 2008.
- KNOPP, S. et al., A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. *J. Clin. Pathol.*, v. 62, p. 212-218, 2009.
- KNOPP, S. et al., P14 ARF, a prognostic Predictor in HPV negative Vulvar Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 126, p. 266-276, 2006.
- KOO, Yu-J. et al., *Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion*. Virchows, 2013.
- KOYAMATSU, Y. et al., A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal and vulvar carcinomas. *Gynecologic Oncology*, v. 90, p. 547-551, 2003.
- LAVORATO-ROCHA, et al., Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. *Tumor Biol.*, 2013.
- LERMA, E. et al., Alterations of the p16 INK4a/ Rb/Cyclin-D1 Pathway in Vulvar Carcinoma, Vulvar Intraepithelial Neoplasia and Lichen Sclerosus. *Molecular Pathology of Vulvar Carcinoma*, v. 33, n. 11, 2002.
- LI, Yu-Z. et al., Expression of Endogenous Hypoxia Markers in Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific J. Cancer Prevention*, v. 13, 2012.

MAGNUSSEN, G. I. et al., High expression of wee1 is associated with malignancy in vulvar squamous cell carcinoma patients. *BMC Cancer*, p. 13-288, 2013.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Série-Biologia Molecular Atualização Parte 2 – Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Rev. Albert Einstein*, 2004.

MUNGUER, K.; GWIN, T. K.; DRUBIN, M. M. *P16 in HPV-associated cancers*. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget/>. Acesso em: 26 dez. 2013.

NGAMKHAM, J. et al., Preliminary Study on Human Papillomavirus Frequency and Specific Type-distribution in Vulva Cancer from Thai Women. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* v. 14, p. 2355-2359, 2013.

OLSEN, J. et al., Incidence and cost of anal, penile, vaginal and vulvar cancer in Denmark. *BMC Public Health*, 2012.

PABUCCU, E. et al., Late recurrence of sigmoid carcinoma mimicking primary vulvar cancer: case report and review of the literature. *Int. J. Clin. Pathol.*, v. 5, p. 609-613, 2012.

PERALTA-ZARAGOZA, O. et al., HPV-Based Screening, Triage, Treatment, and Followup Strategies in the Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics and Gynecol.*, p. 1-15, 2013.

PINO, M. D.; CARUNCHIO, L. R.; ORDI, J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology*, v. 62, p. 161-175, 2013.

PINTO, A. P. Etiopatogenia do cancer vulvar. *Jornal Brasileiro de Patologia e medicina laboratorial*, v. 38, p. 55-63, 2002.

RIETHDORF, S. et al., P16 INK4A Expression as Biomarker for HPV 16 – Related Vulvar Neoplasias. *J. Human Pathology*, v. 35, 2004.

ROBBINS, S. L. et al., *Bases Patológicas das doenças*, Robbins & Cotran Patologia. 7. Elsevier Saunders, 2005.

ROELENS, J. et al., P16INK4a Immunocytochemistry Versus Human Papillomavirus testing for Triage of Women with Minor Cytologic Abnormalities. *Cancer Cytopathology*, 2012.

ROLFE, K. J. et al., Cell cycle proteins as molecular markers of malignant change in vulvar lichen sclerosus. *Int. J. Gynecol Cancer*, v. 11, p. 113-118, 2001.

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

SANJOSÉ, S. de et al., Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *European Journal of Cancer*, v. 49, p. 3450-3461, 2013.

SHUKLA, S. et al., Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J. Med. Res.*, p. 222-233, 2009.

SIDERI, M. et al., Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD vulvar oncology subcommittee. *J. Reprod. Med.*, v. 50, p. 807-810, 2005.

SNIJDERS, P. J. F., STEENBERGEN RDM, HEIDEMAN DAM, et al., HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.*, v. 208, p. 152-164, 2006.

SUTTON, B. C. et al., Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. *Modern Pathology.*, v. 21, p. 345-354, 2008.

TACHEZY, R. et al., Human Papillomavirus Genotype Distribution in Czech Women and Men with diseases Etiologically Linked to HPV. *Plos One.*, v. 6, n. 7, 2011.

TAYLOR, A. H.; GUZAIL, M.; AZZAWI, F. A. Differential expression of oestrogen receptor isoforms and androgen receptor in the normal vulva and vagina compared with vulval lichen sclerosus and chronic vaginitis. *Journal of dermatology*, p. 1365-2133, 2007.

TRIETSCH, M. D. et al., Spindle cell morphology is related to poor prognosis in vulvar squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, v. 109, p. 2259-2265, 2013.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature*, v. 7, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Human Papillomavirus and related Cancers in World. *Summary Report*, 2010.

WUNSCH FILHO, V.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e saúde pública. *Caderno de Saúde Pública*, v. 17, p. 467-48, 2001.

ZAMORA, P. C. et al., Effect of Human Papillomavirus on Cell Cycle-Related Proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in Precursor Lesions of Cervical Carcinoma A tissue microarray study. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 132, p. 378-390, 2009.

ZANNONI, G. F. et al., Changes in the expression of oestrogen receptors and E-cadherin as molecular markers of progression from normal epithelium to invasive cancer in elderly patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Histopathology*, v. 58, p. 265-275, 2011.

* Recebido em: 20.09.2014 Aprovado em: 28.09.2014

JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA

Acadêmica de Biomedicina da PUC Goiás. Estudante de Biomedicina. *E-mail:* jacteixes@gmail.com

VERA APARECIDA SADDI

Professora Doutora, na PUC Goiás. *E-mail:* verasaddi@gmail.com

ANDREA ALVES RIBEIRO

Mestre pela Universidade Federal de Goiás; Professora na PUC Goiás. *E-mail:* andrea.ribeiro13@gmail.com