

Etiopatogenia do câncer vulvar

Etiopathogenesis of vulvar cancer

Álvaro P. Pinto

unitermos

Neoplasia maligna vulvar
Etiopatogenia
Papilomavírus humano
Carcinogênese

resumo

Existem poucos trabalhos na literatura a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do carcinoma vulvar. Estudos que servem como base para a compreensão destes mecanismos são discutidos de forma compreensiva neste artigo de revisão. As alterações genéticas, a associação com o papilomavírus humano (HPV) e outros possíveis fatores envolvidos na carcinogênese dos tumores vulvares são abordados.

abstract

There are few publications in the literature about the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of vulvar cancer. Previous and recent studies that pointed out the basic mechanisms of carcinogenesis at this site are discussed in a comprehensive way by this review article. Genetic disturbs, association with human papillomavirus (HPV) and other possible factors involved in vulvar carcinogenesis are discussed.

key words

Vulvar malignant neoplasm
Etiopathogenesis
Human papillomavirus
Carcinogenesis

Introdução

Entre as neoplasias malignas próprias do sexo feminino, o câncer de vulva apresenta-se como uma das mais raras, com incidência mundial de aproximadamente 1,8/100.000 mulheres, aumentando para até 20/100.000 após a idade de 75 anos. O tipo histológico mais freqüente, representando cerca de 90% dos tumores vulvares, é o carcinoma de células escamosas ou epidermóide (16, 33). A incidência do carcinoma escamoso vulvar (CEV) no Brasil é uma das mais altas do mundo (34).

Discussão

Estudos baseados em dados epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e moleculares indicam a existência de duas categorias de CEV: uma relacionada ao papilomavírus humano (HPV) e a outra não (16).

A primeira categoria de carcinomas escamosos vulvares relaciona-se a doença sexualmente transmissível, oncogênica, causada pelo HPV. Devido ao agente etiológico viral comum, esta classe de tumores vulvares está freqüentemente associada a carcinomas escamosos genitais de outros sítios, principalmente o cervical. Estes tumores são prevalentes em mulheres com idade inferior a 65 anos. Há evidências de que dois tipos histológicos distintos de carcinomas escamosos, denominados verrucóides e basalóides, enquadram-se preferencialmente neste grupo de carcinomas vulvares (42) (Figura 1).

A segunda categoria de carcinomas escamosos vulvares, por sua vez, é de etiologia desconhecida, não estando relacionada com o HPV. Esta classe de tumores prevalece em mulheres com mais de 65 anos, sendo três a quatro vezes mais freqüente que a primeira (32).

Doutor em Patologia pela Faculdade de Medicina de São Paulo/USP; professor adjunto e ginecopatologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFRP). Este trabalho foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

O aspecto histológico observado é geralmente o de carcinoma escamoso clássico, queratinizante (Figura 1). Alguns relatos demonstram, ainda, associação destes tumores com doenças inflamatórias idiopáticas vulvares, que incluem a hiperplasia epitelial e o líquen escleroso (49).

Existem poucas publicações a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese destes dois grupos relacionados acima. São revistos, a seguir, os principais trabalhos que servem como base para a compreensão dos mecanismos patogênicos relacionados ao carcinoma escamoso vulvar. Estes incluem a inter-relação com o papilomavírus humano (58), principal agente carcinogênico na cérvix (56, 59), e com outros fatores envolvidos na carcinogênese dos tumores vulvares.

Fatores de risco e vias patogênicas para o carcinoma escamoso vulvar

O risco de desenvolvimento do câncer vulvar relaciona-se a aspectos comportamentais, reprodutivos, hormonais e genéticos. Fatores que aumentam este risco incluem outros carcinomas genitais, doenças inflamatórias crônicas vulvares, fumo, história de verrugas genitais e carcinomas vulvares incipientes, atualmente denominados neoplasias intra-epiteliais vulvares (15, 24, 28, 53, 64, 85). Dados obtidos durante os últimos 20 anos corroboram o

conceito de que o carcinoma escamoso da vulva, ao contrário do cervical, origina-se a partir de ao menos duas vias patogênicas (16). Uma consiste na infecção pelo papilomavírus humano, originando uma lesão precursora do carcinoma escamoso vulvar, a neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV), a qual, em uma proporção de mulheres, progride para carcinoma invasivo. Outros fatores de risco associados com o processo carcinogênico neste grupo incluem fatores imunológicos, idade e consumo de cigarros. Sobre o tabagismo, faz-se importante um comentário. Nitrosaminas específicas do tabaco foram identificadas no muco do trato genital feminino há mais de uma década (27). Na década passada, o consumo de cigarros foi apontado por estudos epidemiológicos como de risco para o câncer anogenital (22, 17) e um co-fator do HPV em tumores vulvares associados a este vírus (47). Apesar de estas associações serem possivelmente verdadeiras, recentes estudos questionam o papel de uma enzima ativadora destas nitrosaminas – a CYP2D6 – em pacientes portadoras de câncer de pulmão (65) e vulva (12), contrariando resultados de publicações prévias (9). O outro caminho é menos conhecido, mas provavelmente requer o desenvolvimento de alterações em genes do hospedeiro, as quais acumulam-se no epitélio escamoso vulvar. Entre os participantes deste cenário estão as doenças inflamatórias vul-

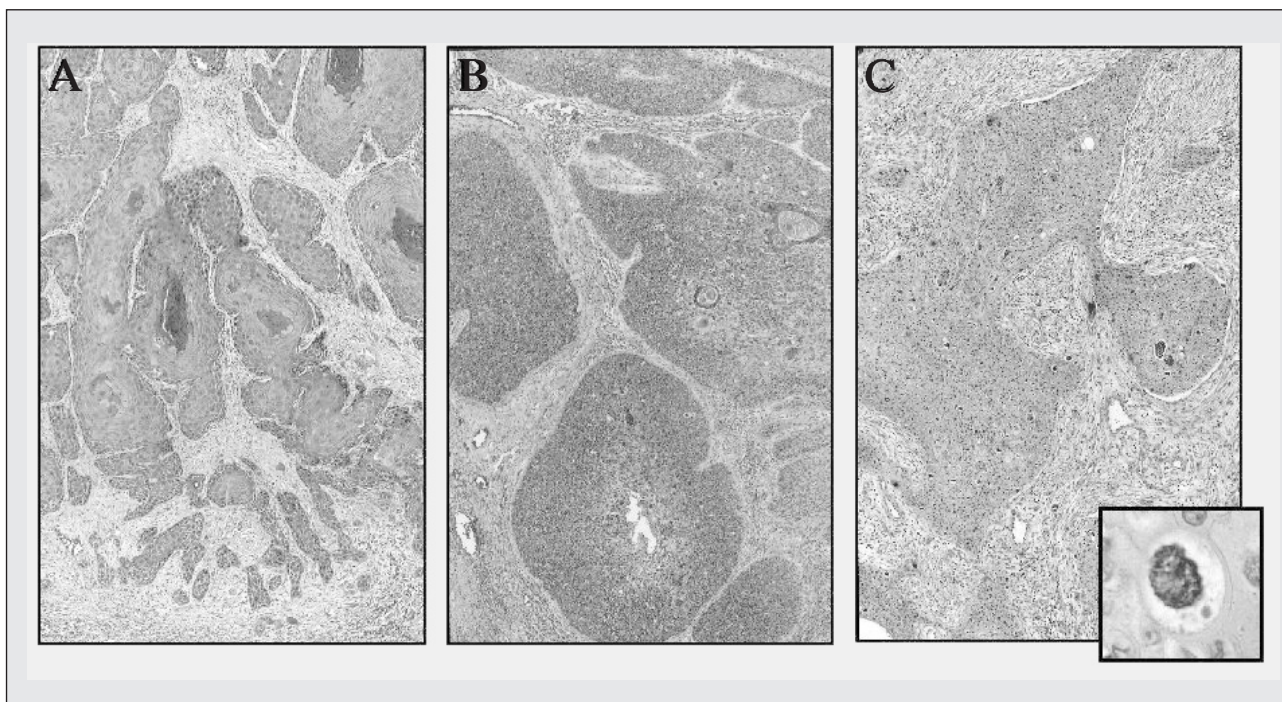


Figura 1 – Subtipos histológicos de carcinoma escamoso vulvar: A. Carcinoma escamoso queratinizante: blocos arredondados de células escamosas com citoplasma abundante e pérolas córneas; B. Carcinoma basalóide: extensas lâminas de células escamosas imaturas de aspecto basalóide; C. Carcinoma verrucóide: extensas faixas anastomosadas de células arranjadas de forma similar à lesão intra-epitelial, com células escamosas pleomórficas. No detalhe, cavitação citoplasmática de aspecto semelhante ao observado na coilocitose da infecção pelo HPV

vares, como o líquen escleroso ou a hiperplasia epitelial, o processo de envelhecimento e o desenvolvimento de atipia citológica. Considerando-se dados morfológicos e clínicos, aproximadamente 30% de carcinomas vulvares estão associados com HPV e formas clássicas de NIV, enquanto uma mesma proporção está associada com anormalidades epiteliais, as quais demonstram atipia em um grupo de líquen escleroso e hiperplasia, configurando lesões denominadas neoplasias intra-epiteliais vulvares diferenciadas. Outro terço de carcinomas vulvares desenvolve-se na ausência de lesão precursora aparente (44) (**Figura 2**). Estas duas vias patogênicas acima relatadas, estariam ligadas às duas categorias de CEV descritas anteriormente.

O fator viral

O papilomavírus humano tem sido proposto como agente etiológico para um grande espectro de doenças do trato genital, entre elas a neoplasia escamosa vulvar (4, 16). Como no carcinoma cervical (59,75), o HPV é fortemente associado com um subgrupo de carcinoma

vulvar e presumidamente atua por meio do desenvolvimento de uma lesão precursora, a NIV.

Neoplasias intra-epiteliais do tipo clássico e carcinomas invasivos com padrões de crescimento que se assemelham a doença intra-epitelial (carcinomas intra-epitelióides ou verrucóides/basalóides) resultam positivas para HPV em torno de 80% dos casos testados por PCR (18). Em contraste, tumores compostos por epitélio escamoso queratinizante bem diferenciado (carcinomas queratinizantes), ou associados a hiperplasias vulvares, líquen escleroso ou atipias (NIV diferenciado), resultam positivos apenas em 13,3% a 16,4% dos casos (4, 57, 73). A maior parte dos estudos concorda que o tipo 16 é o mais frequentemente encontrado, seguido de longe pelos tipos 33 e 18 (10, 25, 31, 57). O HPV 16 é o protótipo do HPV de alto risco em neoplasia vulvar, ocorrendo em aproximadamente 80% dos tumores HPV positivos.

O ciclo de vida do HPV está intimamente associado com o programa de diferenciação da célula epitelial hospedeira (70). O papilomavírus humano infecta as células

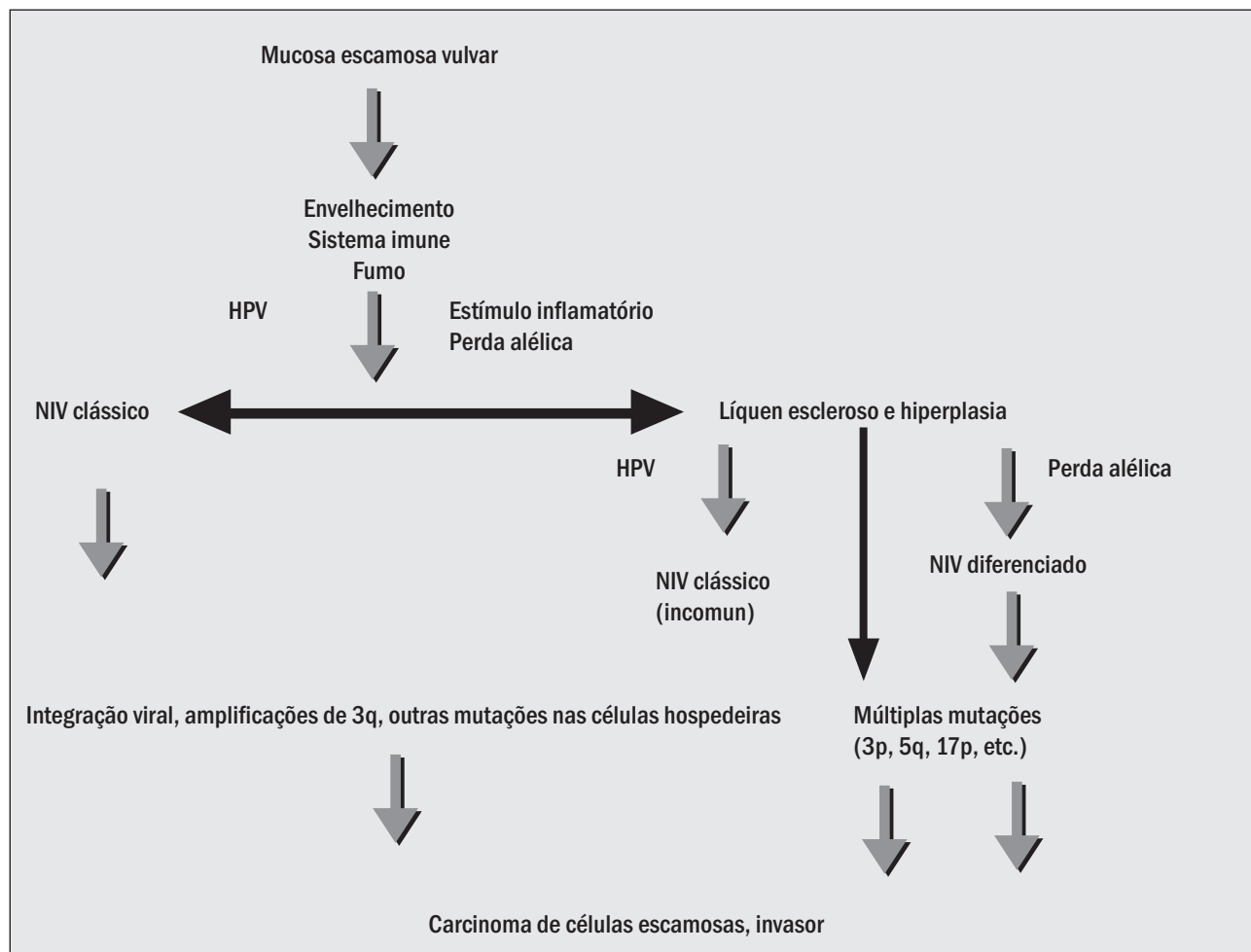


Figura 2 – Diagrama demonstrando os vários caminhos patogênicos do carcinoma escamoso invasivo vulvar. NIV = neoplasia intra-epitelial vulvar

basais do epitélio por meio de defeitos na mucosa escamosa. Uma vez nas células, a expressão do vírus é firmemente controlada e a replicação inicia-se em função da maturação epitelial. Este processo é associado com a expressão de genes estruturais tardios e a produção de capsídeos virais e/ou proteínas tardias (L1 e L2), na superfície epitelial. O fato de as células superficiais serem submetidas a diferenciação impede a transformação neoplásica. Além disso, as influências regulatórias de certas unidades de tradução do HPV (E1 e E2), no contexto do ciclo viral normal, podem impedir a expressão de seqüências críticas para a transformação neoplásica nas células em replicação (Figura 3).

Papilomavírus associados a câncer, como o HPV 16, tipicamente não progridem de maneira regular em direção ao processo de maturação viral, acumulando-se no epitélio infectado. Aceita-se que a expressão desregulada de oncogenes virais, especificamente E6 e E7, ocorra na população celular em replicação (células parabasais) e altere irreversivelmente suas características de crescimento (50) (Figura 3). De maneira semelhante às oncoproteínas de outros vírus de DNA, como o adenovírus e o vírus símio 40, as proteínas E6 e E7 do HPV interagem com proteínas reguladoras do ciclo celular, como o p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb) (21, 80). Além disso, indução de defeitos mitóticos e instabilidade genômica também ocorrem como consequência da ação destes dois genes, que induzem (E7) e potencializam (E6) distúrbios

mitóticos relacionados à duplicação anormal de centríolos (20).

Em algum momento na patogênese do carcinoma, geralmente no ponto de transição entre a doença intraepitelial e a invasiva, o vírus é covalentemente ligado ao DNA cromossômico. Diferente da integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, que é aparentemente randômica (13, 60, 68), a integração do genoma viral no DNA da célula carcinomatosa hospedeira ocorre sempre entre E1 e E2, resultando na perda ou alteração de E2, enquanto outras regiões do genoma viral permanecem intactas (6, 66). O produto do gene E2 é uma proteína ligante de DNA que tem um papel indireto na transformação, por meio da regulação da transcrição do promotor de E6/E7 dos HPV 16 e 18 (8, 61, 72). Deste modo, a integração e a perda da função de E2 resultam na produção excessiva das proteínas E6 e E7 (77); E1, por sua vez, tem atividade helicase, a qual influencia positivamente a replicação de DNA. Conseqüentemente, a perda funcional de ambos os genes pode contribuir, direta ou indiretamente, para a perda da função viral normal e desenvolvimento de imortalização da célula hospedeira (2).

Fatores do hospedeiro

A maior parte dos carcinomas vulvares (cerca de 70%) não parece estar relacionada ao HPV (32, 57). Este grupo de tumores apresenta e é precedido por alterações

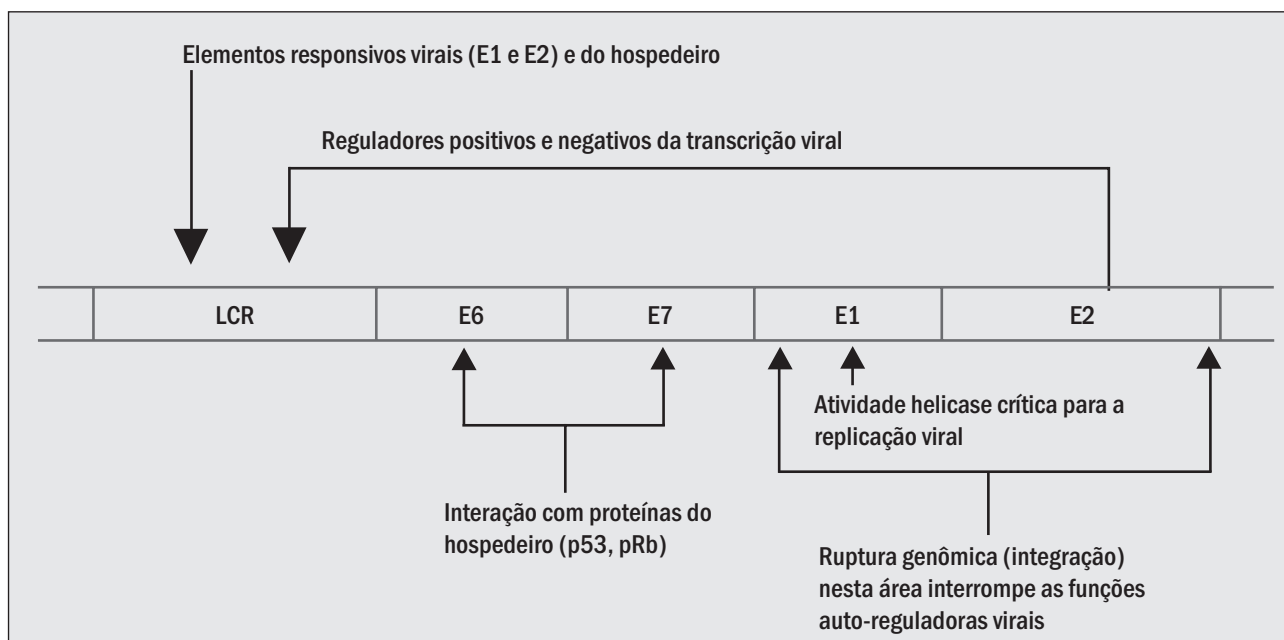


Figura 3 – Esquema demonstrando os principais elementos virais envolvidos no processo de oncogênese: a expressão dos oncogenes E6 e E7 e a integração do genoma viral, a qual rompe o controle regulatório de elementos de E1 e E2 sobre a transcrição

genéticas específicas verificadas por estudos de clonalidade e perda alélica, entre outros que serão discutidos a seguir.

Gene supressor de tumor p53

Estudos genéticos moleculares têm associado mutações em p53 a tumores HPV negativos. Três artigos correlacionaram cuidadosamente mutação em p53 e a presença de HPV em tumores vulvares. Kim *et al.*, Lee *et al.* e Milde-Langosch *et al.* encontraram uma forte correlação entre mutações em p53 e cânceres vulvares HPV negativos (40, 43, 48). Tumores vulvares HPV positivos, a exemplo de seus pares na cérvix, raramente apresentam mutações. Estudos imunoistoquímicos não têm obtido sucesso em discriminar tumores HPV negativos, devido ao fato de a expressão aumentada da proteína p53 poder refletir outros fenômenos além de mutação genética (38, 79). Apesar deste fato, um estudo recente demonstrou que alterações neste gene parecem estar envolvidas no desenvolvimento de NIV diferenciado e que a imunoistoquímica para a proteína p53 pode ser útil no diagnóstico diferencial desta entidade (83).

Gene supressor de tumor PTEN

Um candidato a gene supressor de tumor designado PTEN e localizado no cromossomo 10q23.3 tem sido demonstrado em cerca de 40% dos carcinomas endometriais, bem como em hiperplasias de endométrio (69, 84). Recentemente, um estudo demonstrou que este mesmo gene encontra-se transformado em carcinomas vulvares e NIV, podendo estar relacionado também com a patogênese do carcinoma vulvar (30).

Estudos de perda alélica (perda de heterozigosidade – LOH) e instabilidade genética em mucosa/pele adjacente a tumor

Um estudo de Worsham *et al.* (81), baseado em citogenética, demonstrou uma alta frequência de anormalidades no cariótipo de células derivadas de carcinoma escamoso vulvar. Um outro estudo determinou, recentemente, as frequências de perda alélica em carcinomas escamosos invasivos vulvares HPV positivo e negativo, por meio de PCR, com marcadores de regiões micros-satélites (54) (Figura 4).

Em contraste com o estudo de Worsham *et al.*, o de Pinto *et al.* (54) identificou um espectro maior de perdas alélicas, incluindo LOH, em mais de 30% dos casos informativos nos cromossomos 1p, 5q, 10p, 10q, 11q, 15q,

21q (em dois diferentes *loci*) e 22q. Prevalências altas de LOH (acima de 50%) foram encontradas nos cromossomos 2q, 3p, 8p, 8q, 17p e 21q (em três *loci*) por este estudo. A Tabela compara os achados de perda alélica obtidos pelos dois estudos citados. Segundo o estudo de Pinto *et al.*, carcinomas escamosos HPV positivos e negativos exibem um largo espectro de perdas alélicas. Algumas destas perdas (3p, 5q, 8p, 10p, 11q, 17p) são comuns em carcinomas escamosos de outros sítios, enquanto outras (2q, 8q, 10q, 15q e 22q) parecem estar mais intimamente associadas a esta topografia. Outro estudo analisou dez carcinomas escamosos vulvares por hibridização genômica comparativa e detectou aberrações cromossômicas em oito casos. As mais freqüentes foram perdas cromossômicas em 4p, 3p e 5q e ganhos em 3q e 8p (37). A identificação de *loci* por estudos de LOH, como os descritos acima, serve como base para estudos em lesões precursoras do carcinoma escamoso associadas a tumores HPV positivos e negativos (45, 55, 23).

A prevalência mais alta de LOH foi observada no cromossomo 17p (58,3%) (54). Este braço cromossômico é sítio do gene supressor tumoral p53, e estudos de mapeamento deste cromossomo têm demonstrado envolvimento consistente de seu *locus* gênico localizado em 17p13.1, o TP53, bem como do *locus* CHRN1 em 17p12-p11.1, em carcinomas de cabeça e pescoço (1, 82). Um destes estudos apontou ainda para a possibilidade de a região 17p12-p11 conter um novo gene supressor de tumor (1). No estudo de Pinto *et al.*, uma proporção mais alta de tumores HPV negativos apresentou perdas alélicas no cromossomo 17p (4/5 vs. 3/7), em comparação com tumores HPV positivos. Este achado foi confirmado por um estudo subsequente (23) que

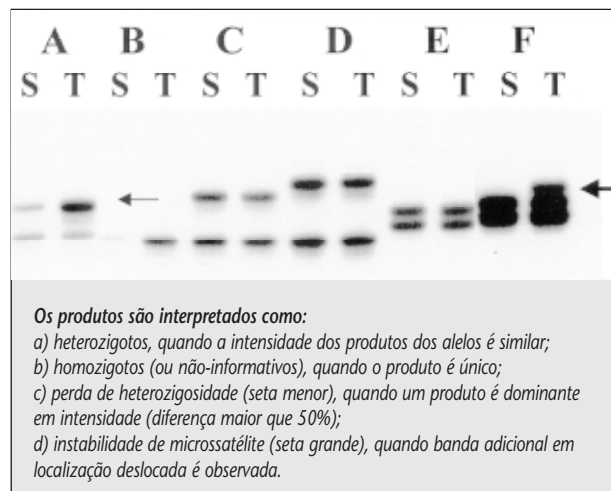


Figura 4 – Gel de poli-acrilamida exibindo loci polimórficos amplificados por PCR a partir de DNAs extraídos de tecidos estromal (S) e tumoral (T)

Tabela

Perdas cromossômicas em carcinoma vulvar por análise de cariótipo e por método molecular: comparação de resultados

Perdas cromossômicas	N/T*	%	LOH	N/T*	%
			2q	7/14	50,0
3p	5/6	83,3	3p	6/12	50,0
5q	4/6	66,6	5q	6/14	42,9
8p	5/6	83,3	8p	7/14	50,0
			8q	8/14	57,1
10q	4/6	66,6	10p	4/9	44,4
15q	3/6	50,0	10q	4/9	44,4
			15q	5/14	35,7
18q	4/6	66,6	17p	7/12	58,3
19p	4/6	66,6	n t		
			21q	6/13	46,2
22q	5/6	83,3	21q	6/14	42,9
Xp	5/6	83,3	21q	7/14	50,0
			22q	4/10	40,0

Fontes: Worsham et al. e Pinto et al.

* Número de casos com deleção cromossômica ou perda de heterozigidade/número total de casos.

investigou perdas alélicas pela mesma metodologia, porém concentrando-se no cromossomo 3p e em *loci* de genes supressores de tumores 13q14 (RB) e 17p13.1 (p53). Este último mostrou-se mais prevalente em tumores HPV negativos, em um total de 30 tumores estudados (62% de 15 tumores HPV negativos *versus* 15% de 15 tumores HPV positivos; $p = 0,02$). De forma semelhante, mutações de p53 parecem ser mais comuns em carcinomas escamosos vulvares (VSCCs) HPV negativos (40, 43, 48).

Estudos de clonalidade de lesões precursoras HPV positivas e negativas

A ocorrência de mutações no epitélio vulvar, no decorrer do processo de envelhecimento, é a melhor explicação para o aumento significativo da incidência de câncer vulvar após os 75 anos de idade (14, 41, 67). Um método para determinação de clonalidade, baseado na inativação (metilação) do gene receptor de androgênio, situado no cromossomo X, foi desenvolvido recentemente para caracterizar este epitélio (3, 76). Monoclonalidade tem sido considerada sinônimo de neoplasia escamosa, e tem sido demonstrada em neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) em estudos recentes (52). No caso do epitélio vulvar, as questões que têm sido sugeridas referem-se à possibilidade de NIV, líquen escleroso e hiperplasia epitelial serem

monoclonais. Neoplasias intra-epiteliais vulvares do tipo clássico (CNIV) têm se apresentado, quase na sua totalidade, monoclonais (71), principalmente nos graus mais avançados (NIV 3) (78). Em contrapartida, num estudo de hiperplasias vulvares e líquen escleroso associados a carcinomas invasores, aproximadamente metade das hiperplasias e o líquen escleroso foram monoclonais (71). Em outro estudo, hiperplasias vulvares adjacentes a quatro carcinomas vulvares HPV negativos mostraram-se policlonais, e não apresentaram mutações de p53 no estudo de Kim *et al.* (40). Com base nestes estudos, pode-se afirmar que hiperplasias vulvares representam uma categoria heterogênea e podem ou não estar relacionadas com os carcinomas aos quais estão justapostas. A presença de monoclonalidade em líquen escleroso é discutível, e poucos estudos têm sido executados nestas lesões com o objetivo de determinar se este achado é uma constante ou um fenômeno raro, ou, ainda, se é um marcador para progressão neoplásica.

Vários avanços do conhecimento vêm ocorrendo também no tocante à evolução e ao prognóstico dos tumores invasivos vulvares. Entre eles destacam-se recentes estudos sobre angiogênese (36, 46), regulação da apoptose (26), papel das citocinas e fatores de transcrição (64, 74), e diversos fatores prognósticos (29, 47, 62). Todavia estes

não serão aqui abordados, uma vez que apresentam importância menor em estágios precoces do desenvolvimento tumoral.

Questões não-resolvidas na dicotomia papilomavírus/mutações da célula hospedeira

As descrições prévias detalham dois cenários distintos na patogênese do câncer vulvar, os quais podem incluir agentes etiológicos diversos, lesões precursoras e carcinomas invasores. Entretanto tumores HPV positivos e negativos compartilham vários fatores em comum. Entre eles destaca-se o fato de o HPV e o líquen escleroso vulvar poderem cooperar na gênese de neoplasias vulvares (5, 25, 39), bem como de o processo de envelhecimento ser um fator importante, tanto em neoplasias vulvares relacionadas ao HPV quanto em neoplasias não-relacionadas à etiologia viral (25, 51). Um recente estudo por nós conduzido demonstrou desequilíbrio alélico (IA) em líquen escleroso, hiperplasia, NIV diferenciado (HPV negativo) e NIV clássico (HPV positivo), com frequência entre 40% e 60%, envolvendo ao menos um *locus* cromossômico (55). Foram observadas frequências semelhantes de IA entre lesões HPV positivas e negativas e entre lesões associadas e não-associadas a tumores invasivos adjacentes. Este alto

grau de instabilidade genética na pele ou na mucosa adjacentes a tumores vulvares foi constatado por estudos com metodologias diversas (11, 45), e parece ocorrer mesmo na ausência de lesões morfológicamente detectáveis.

Conclusão

A possibilidade de que alterações genéticas precoces influenciem ambos os caminhos da carcinogênese vulvar discutidos neste artigo de revisão é intrigante e deve ser a tônica de estudos futuros.

Agradecimentos

O autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à World Association of Societies of Pathology (WASP) e ao Pemberton Fellowship Fund at Brigham and Women's Hospital, pelo suporte financeiro durante quatro anos, para a realização do programa de doutorado, período em que foi desenvolvida a base de conhecimento sobre o assunto deste artigo. O autor agradece também à acadêmica Olívia Russo Cruz pela colaboração no preparo deste trabalho.

Referências

1. Adamson, R.; Jones, A.S. & Field, J.K. Loss of heterozygosity studies on chromosome 17 in head and neck cancer using microsatellite markers. *Oncogene*, 9(7): 2077-82, 1994.
2. Alani, R.M. & Munger, K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J. Clin. Oncol.*, 16: 330-7, 1998.
3. Allen, R.C. et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 1229-39, 1992.
4. Andersen, W.A. et al. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: two separate entities? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165: 329-36, 1991.
5. Ansink, C.A. et al. Human papillomavirus, lichen sclerosus, and squamous cell carcinoma of the vulva: detection and prognostic significance. *Gynecol. Oncol.*, 52: 180-4, 1994.
6. Baker, C.C. et al. Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.*, 61: 962-71, 1987.
7. Beckmann, A.M.; Hagensee, M.E. & Galloway, D.A. Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89(20): 1516-23, 1997.
8. Bernard, B.A. et al. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.*, 63(10): 4317-24, 1989.
9. Bouchardy, C.; Benhamou, S. & Dayer, P. The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res.*, 56(2): 251-3, 1996.
10. Buscena, J. et al. The predominance of human papillomavirus type 16 in vulva neoplasia. *Obstet. Gynecol.*, 71: 601-6, 1988.
11. Carlson, J.A. et al. Chromosome 17 aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization in vulvar squamous cell carcinomas and synchronous vulvar skin. *Am. J. Pathol.*, 157(3): 973-83, 2000.
12. Chen, C. et al. CYP2D6 genotype and the incidence of anal and vulvar cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8(4 Pt 1): 317-21, 1999.
13. Couturier, J. et al. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J. Virol.*, 65(8): 4534-8, 1991.
14. Cramer, D.W. & Cutler, S.J. Incidence and histopathology of malignancies of the female genital organs in the United States. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 118: 443-60, 1974.
15. Cramer, D.W. Epidemiology of the gynecologic cancers. *Compr. Ther.*, 4: 9-17, 1978.
16. Crum, C.P. Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. *Obstet. Gynecol.*, 79(3): 448-54, 1992.
17. Daling, J.R. et al. Cigarette smoking and the risk of anogenital cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 135(2): 180-9, 1992.

18. DiPaolo, J.A. et al. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral ras. *Oncogene*, 4: 395, 1989.
19. Drew, P.A. et al. Prognostic factors in carcinoma of the vulva: a clinicopathologic and DNA flow cytometric study. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 15: 235-41, 1996.
20. Duensing, S. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(18): 10002-7, 2000.
21. Dyson, N.P. et al. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243: 934, 1989.
22. Edwards, C.L. & Balat, O. Characteristics of patients with vulvar cancer: an analysis of 94 patients. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 17(5): 351-3, 1996.
23. Flowers, L.C. et al. Genetic changes during the multistage pathogenesis of human papillomavirus positive and negative vulvar carcinomas. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 6(4): 213-21, 1999.
24. Gosling, J.R.G. et al. Infiltrative squamous cell (epidermoid) cancer of vulva. *Cancer*, 14: 330-43, 1961.
25. Haefner, H. et al. Vulvar intraepithelial neoplasia: age, morphological phenotype, papillomavirus DNA and coexisting invasive carcinoma. *Human Pathol.*, 26: 147-54, 1995.
26. Hantschmann, P. & Kurzl, R. Regulation of apoptosis in squamous cell carcinoma of the vulva. *J. Reprod. Med.*, 45(8): 633-42, 2000.
27. Hellberg, D. et al. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158(4): 910-3, 1988.
28. Henson, D. & Tarone, R. An epidemiologic study of cancer of the cervix, vagina, and vulva based upon the Third National Cancer Survey in the United States. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 129: 525-32, 1990.
29. Hoffmann, G. et al. Value of p53, urokinase plasminogen activator, PAI-1 and Ki-67 in vulvar carcinoma. *Zentralbl Gynakol.*, 121(10): 473-8, 1999.
30. Holway, A.H. et al. Somatic mutation of PTEN in vulvar cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6(8): 3228-35, 2000.
31. Hording, U. et al. Human papillomavirus in vulvar squamous-cell carcinoma and in normal vulvar tissues: a search for a possible impact of HPV on vulvar cancer prognosis. *Int. J. Cancer*, 55: 394-6, 1993.
32. Hording, U. et al. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomavirus: indications for two different etiologies. *Gynecol. Oncol.*, 52: 241-6, 1994.
33. Ikenberg, H. Human papillomavirus DNA in invasive genital carcinomas. In: Gross, Iablowski, Pfister & Stegner. *Genital papillomavirus infections: modern diagnosis and treatment*. 1990, p. 93-105.
34. International Agency For Research On Cancer (WHO), International Association of Cancer Registries. *Cancer incidence in five continents*. Vol. IV. Lyon: IARC Scientific Publications, 1982, p. 42.
35. International Agency For Research On Cancer (WHO), International Association of Cancer Registries. *Cancer incidence in five continents*. Vol. VI, Lyon: IARC Scientific Publications, 1992, p. 120.
36. Abulafia, O.; Triest, W.E. & Sherer, D.M. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol. Oncol.*, 72(2): 220-31, 1999.
37. Jee, K.J. et al. Loss in 3p and 4p and gain of 3q are concomitant aberrations in squamous cell carcinoma of the vulva. *Mod. Pathol.*, 14(5): 377-81, 2001.
38. Kagie, M.J. et al. P53 protein overexpression, a frequent observation in squamous cell carcinoma of the vulva and in various synchronous vulvar epithelia, has no value as a prognostic marker. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 16: 124-30, 1997.
39. Kiene, P. et al. Human papillomavirus infection in vulvar lesions of lichen sclerosus et atrophicus. *Arch. Dermatol. Res.*, 283: 445-8, 1991.
40. Kim, Y.T. et al. P53 mutations and clonality in vulvar carcinomas and squamous hyperplasias suggesting that squamous hyperplasias do not serve as direct precursors of human papillomavirus-negative vulvar carcinomas. *Hum. Pathol.*, 27(4): 389-95, 1996.
41. Krain, L.S. Carcinoma of the vulva in California 1942-1969: the California tumor registry experience. *Oncol.*, 28: 110-6, 1973.
42. Kurman, R.J.; Toki, T. & Schiffman, M.H. Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am. J. Surg. Pathol.*, 17(2): 133-45, 1993.
43. Lee, Y.Y. et al. Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. *Oncogene*, 9: 1655-9, 1994.
44. Leibowitch, M. et al. The epithelial changes associated with squamous cell carcinoma of the vulva; a review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 97: 1135-9, 1990.
45. Lin Ming-Chieh et al. Patterns of allelic loss (LOH) in vulvar squamous carcinomas and adjacent noninvasive epithelia. *Am. J. Pathol.*, 152(5), 1998.
46. Lopez-Ocejo, O. et al. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*, 19(40): 4611-20, 2000.
47. Madeleine, M.M. et al. Expression of Ki-67 in vulvar carcinoma and vulvar intraepithelial neoplasia III: correlation with clinical prognostic factors. *Gynecol. Oncol.*, 76(1): 51-5, 2000.
48. Milde-Langosch, K. et al. Presence and persistence of HPV infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva. *Int. J. Cancer*, 63(5): 639-45, 1995.
49. Mitchell, M.F. et al. Second genital primary squamous neoplasms in vulvar carcinoma: viral and histopathologic correlates. *Obstet. Gynecol.*, 81(1): 13-8, 1993.
50. Munger, K. et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.*, 63: 4417, 1989.
51. Park, J.S. et al. Possible etiologic heterogeneity of vulvar intraepithelial neoplasia. A correlation of pathologic characteristics with human papillomavirus detection by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Cancer*, 67: 1599-607, 1991.
52. Park, T.W. et al. Association between human papillomavirus type and clonal status of cervical squamous intraepithelial lesions. *Natl. Cancer Inst.*, 88(6): 355-8, 1996.

53. Peters, R.K.; Mack, T.M. & Bernstein, L. Parallels in the epidemiology of selected anogenital carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72: 609-15, 1984.
54. Pinto, A.P. et al. Allelic loss in human papillomavirus positive and negative vulvar squamous carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 154(4): 1009-15, 1999.
55. Pinto, A.P. et al. Allelic imbalance in lichen sclerosus, hyperplasia, and intraepithelial neoplasia of the vulva. *Gynecol. Oncol.*, 77(1): 171-6, 2000.
56. Pinto, A.P. & Crum, C.P. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 43: 352-62, 2000.
57. Pinto, A.P. et al. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecol. Oncol.*, 74(1): 61-7, 1999.
58. Pinto, A.P.; Lin, M.C. & Crum, C.P. Molecular and viral pathogenesis of vulvar cancer. In: Luesley, D.M. *Vulvar cancer: molecular and viral events*. London: Arnold, 1999.
59. Pinto, A.P. & Tulio, S. *Co-fatores do HPV na oncogênese cervical*. Submetido à *Revista da Associação Médica Brasileira* em outubro de 2000 e aceito para publicação.
60. Popescu, N.C. & DiPaolo, J.A. Preferential sites for viral integration on mammalian genome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 42: 157-71, 1989.
61. Romanczuk, H.; Thierry, F. & Howley, P.M. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters. *J. Virol.*, 64: 2849-59, 1990.
62. Salmaso R. et al. Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 21(5): 479-83, 2000.
63. Sengupta, B.S. Carcinoma of the vulva in Jamaican women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 60: 537-44, 1981.
64. Seppanen, M. & Vihko, K.K. Activation of transcription factor NF-kappaB by growth inhibitory cytokines in vulvar carcinoma cells. *Immunol. Lett.*, 74(2): 103-9, 2000.
65. Shaw, G.L. et al. Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7(3): 215-9, 1998.
66. Shirasawa, H. et al. Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas. *J. Virol.*, 62: 1022, 1988.
67. Silverberg, E. *Statistical and epidemiological information on gynecologic cancer*. Atlanta: American Cancer Society, 1980, p. 9.
68. Smith, P.P. et al. Human papillomavirus viral integration and fragile sites in HPV immortalized human keratinocyte cell lines. *Genes Chrom. Cancer*, 5: 150-72, 1992.
69. Sun, H. et al. Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 115(1): 32-8, 2001.
70. Taichman, L.B. & LaPorta, R.F. The expression of papillomaviruses in epithelial cells. In: Salzman, N.P. & Hoeley, P.M. (eds.) *The papovaviridae*. Nova York: Plenum Press, 1987.
71. Tate, J.E. et al. Monoclonal origin of vulvar intraepithelial neoplasia and some vulvar hyperplasias. *Am. J. Pathol.*, 150(1): 315-22, 1997.
72. Thierry, F. & Yanif, M. The BPV-1-E² trans-acting protein can be either an activator or repressor of the HPV 18 regulatory region. *EMBO J.*, 6(11): 3391-7, 1987.
73. Toki, T. et al. Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int. J. Gynecol.*, 10: 107-25, 1991.
74. Vihko, K.K. et al. Regulation of proliferation of UM-SCV-1A and UM-SCV-6 vulvar carcinoma cells by cytokines. *Cancer Immunol. Immunother.*, 43(6): 368-74, 1997.
75. Villa, L.L. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv. Cancer Res.*, 71: 321-41, 1997.
76. Vogelstein, B. et al. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science*, 227: 642-5, 1985.
77. Vousden, K.H.; Wrede, D. & Crook, T. HPV oncoprotein function: releasing the brakes on cell growth control. *Papillomavirus Report*, 2: 1-3, 1991.
78. Wada, H. et al. Immunohistochemical localization of telomerase hTERT protein and analysis of clonality in multifocal vulvar intraepithelial neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 114(3): 371-9, 2000.
79. Walts, A.E.; Koeffler, H.P. & Said, J.W. Localization of the p53 protein and human papillomavirus in anogenital squamous lesions: immunohistochemical and in situ hybridization studies in benign, dysplastic, and malignant epithelia. *Hum. Pathol.*, 24: 1238-42, 1993.
80. Werness, B.A.; Levine, A.J. & Howley, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248: 76-9, 1990.
81. Worsham, M.J. et al. Consistent chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the vulva. *Genes. Chrom. and Cancer*, 3: 420-32, 1991.
82. Wu, C.L. et al. Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Res.*, 54(24): 6484-8, 1994.
83. Yang, B. & Hart, W.R. Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *Am. J. Surg. Pathol.*, 24(3): 429-41, 2000.
84. Yokoyama, Y. et al. Expression of PTEN and PTEN pseudogene in endometrial carcinoma. *Int. J. Mol. Med.*, 6(1): 47-50, 2000.
85. Zaino, R.J. Carcinoma of the vulva, urethra, and Bartholin's glands. In: Wilkinson, E.J. (ed.) *Pathology of the vulva and vagina*. Nova York: Churchill Livingstone, 1987, p. 119-53.

Endereço para correspondência

Álvaro P. Pinto
 Serviço de Anatomia Patológica
 Hospital de Clínicas - Universidade
 Federal do Paraná (HC/UFPR)
 Rua General Carneiro 181
 CEP 80069-900 - Curitiba-PR