Expressão Imunoistoquímica dos Marcadores Ki 67 e p53 no Líquen Escleroso Vulvar e no Carcinoma Epidermóide da Vulva

Responsável pelo Projeto: Maria Cristina Barcellos

Orientador: Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira

Co-orientador: Dr. Cláudio Galleano Zettler

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

Ano de 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Expressão Imunoistoquímica dos Marcadores Ki 67 e p53 no Líquen Escleroso Vulvar e no Carcinoma Epidermóide da Vulva

Responsável pelo Projeto: Maria Cristina Barcellos

Orientador: Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira

Co-orientador: Dr. Cláudio Galleano Zettler

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

Ano de 2009

Agradecimentos e dedicatórias:

Aos meus pais Castilho e Eny pelo exemplo de vida e pelo ensinamento contínuo e diário

Ao meu marido, Carlos Eduardo Anselmi , pelo amor durante a nossa jornada

Ao meu orientador, mestre e Professor Gustavo Py Gomes da Silveira sempre presente nas minhas conquistas e vitórias na vida profissional

Ao meu co-orientador Professor Cláudio Zettler pela dedicação e pelo tempo

À Rosalva Meurer e Terezinha Stein pela disponibilidade e atenção

Ao residente da patologia Felipe Carvalho e ao Dr Roque Furian pela grande contribuição nos diagnósticos.

Às minhas amigas e colegas de profissão Suzana Arenhart Pessini e Karina Mazzarino Bassols pela amizade de todos os dias

Ao Dr Waldemar Rivoire, Ivonice dos Santos, Dr Renan Bonamigo, Dra Marilda da Cruz Fernandes, Marília Zordan, Professor Délcio Mendes Gonçalves e todas as secretárias da patologia e do programa de pós-graduação

Meu muitíssimo obrigada, de coração.

Sumário

Lista de abreviaturas.....05

Introdução.....06

Objetivos.....06

Delineamento do estudo.....07

Local do estudo.....07

Artigo em inglês.....08

Artigo em português.....30

Referências.....53

Anexos 62

Lista de abreviaturas

AIP: alto índice proliferativo

BIP: baixo índice prliferativo

CHSCPA: Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre

DAB: diaminobenzina

DNA: ácido desoxirribonucléico

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HPV: papilomavírus humano

ISGP: sociedade internacional de patologia ginecológica

ISSVD: sociedade internacional de estudo das doenças vulvares

LE: líquen escleroso

PBS: solução-tampão fosfato

PD-ECGF: fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VIN: vulvar intraepithelial neoplasia (neoplasia intraepitelial vulvar)

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Introdução

Descrito por Breisky em 1885 em artigo na Zeit Heilk sob o título “ Über Kraurosis vulvae” (Breisky, 1885) e com sua nomenclatura já modificada, o líquen escleroso é a afecção benigna mais freqüente da pele vulvar. De etiologia ainda desconhecida, com teorias auto-imunes, pode comportar-se clinicamente de forma bastante variável e produzir alterações inflamatórias locais que conferem risco para a neoplasia maligna vulvar. A associação com o carcinoma epidermóide da vulva é descrita e há estudos buscando alterações precoces de pele liquenificada que possam predizer a transformação maligna. Neste estudo os autores estudam a expressão imunoistoquímica dos marcadores p53 e ki67 no líquen escleroso presente em peças de vulvectomia por carcinoma epidermóide e avaliam a associação com a expressão desses mesmos marcadores na área tumoral

Palavras-chave: líquen escleroso vulvar, carcinoma epidermóide da vulva, Ki 67, p53.

Objetivos:

Geral:

Avaliar a expressão imunoistoquímica de ki 67 e p53 em peças de vulvectomia por carcinoma epidermóide que apresentem líquen escleroso associado.

Específico:

Avaliar a expressão imunoistoquímica dos marcadores ki 67 e p53 no líquen escleroso e a associação com a expressão dos marcadores ki 67 e p53 no carcinoma epidermóide vulvar.

Delineamento do estudo:

Estudo transversal, descritivo, observacional

Local da pesquisa

Este estudo foi realizado nos laboratórios de Patologia e Imunopatologia do CHSCPA e UFCSPA respectivamente, analisando material proveniente do CHSCPA.

Immunohystochemical Expression of Ki 67 and p53 markers in Vulvar Lichen Sclerosus and Vulvar Epidermoid Carcinoma

Barcellos MC; Py Gomes da Silveira G; Zettler, CG.

Abstract

Described by Breisky in 1885 in article in Zeit Heilk under the title “Uber Kraurosis Vulvae”(Breisky, 1885) and with his revised nomenclature, lichen sclerosus is the most frequent benign affection of vulva skin. From unknown etiology yet, with autoimmune theories, it may clinically behave as very variable form and produce local inflammatory changes which cause risk to the vulva malign neoplasia. The association with vulva epidermoid carcinoma is described and there are studies seeking precocious alterations of lichen skin which may foretell the malign transformation. In this study the authors analyze the immunohystochemical expression of p53 and ki67 markers in the lichen sclerosus presents in vulvectomy samples for epidermoid carcinoma and evaluate the association with the expression of these same markers in tumor area.

Keywords: vulvar lichen sclerosus, vulvar epidermoid carcinoma, Ki67, p53

Literature Revision

The vulva carcinoma represents 4% of malign gynecological neoplasias , being the latter (average of 65 years) and for a long time associated to various clinical disturbances, as for example, diabetes, HAS and obesity. Still without a determined etiological factor, many cofactors are being studied as direct or indirect implications in the carcinogenic effect, among them the presence of lesions or vulva chronic disturbances linked to itch. Among vulva benign epithelial alterations which may further itch, is found lichen sclerosus (LS), which furthers slimming and hardening of the vulva skin, causing slimming of the labia majora, labia minora and clitoris. The lichen sclerosis is the most common of the benign diseases of the vulva , being its prevailing of 1:300 to 1:1000, with predilection for the Caucasian women between 40 and 70 years of age (Franck and Young, 1995; Powell and Wojnarowska ,1999). It may occur in men and children (Franck and Young ,1995; Powell and Wojnarowska, 1999; Pelisse, 2001). Etiology still is unknown and may appear at any part of the body slowly, insidious and progressively.(Crum, 1996) The theories for its emerging are various, going from autoimmune, infectious and also hormonal disease. The several hypotheses for etiopathogenia of LE try to explain if the narrow association with vulva cancer are correlated to manifestation of autoimmune diseases, genetic alterations, among others. Autoimmune disease theories were already referred to, because of carriers of vulva lichen having antibodies for autoimmune diseases in higher levels than populations without the disease – special example the thyroidopathies (Powell and Wojnarowska, 1999). Koeber's phenomenon, that is the existence of lichen sclerosis in damaged or

traumatized epithelial areas suggest that this pathology has predisposition such as autoimmune and genetic (Powell and Wojnarowska, 1999). It's been dug out Borrelia burgdorferi as an eventual etiologic agent, infectious, but the results are not conclusive ones (De Palo and Stefanon, 1996) Low levels of androstenedione and diidrotestosterone and diminishing of activity of 5-alpha redutase were mentioned in some experiences.(Rodrigues de Lima, 1999).

Lesion produced by lichen one histologically express by a reduction of epithelial digital form structure, colagenização and reduction of skin elastic component. It occurs a cell infiltrated of chronic inflammatory type, hiperceratose and total absence of melanocytes showing atrophic lesion clinic aspect. The cytology analysis may show abundant rubbings in cells with paraceratosis and hyperceratosis , hard to differentiate from other hyperplasic vulva lesions (Kashimura and cols, 1993; Franck and Young , 1995 ;Van Hoeven and cols, 1997). The lichen simplex chronicus is an eczematose disease that is also shown many times with signs and symptoms alike to lichen sclerosus, being therefore important different diagnosis.

The lichen simplex is clinically shown with areas of hypo pigmentation and slimming of the skin and represents the final stage of a wide variety of causal agents, without, however, with the progressive loss of skin elastic structure (without change in vulva anatomy) as the lichen sclerosus determines.(ACOG , 2008) Lichen planus is another inflammatory dermatosis of genital mucosa and is shown in many varied forms. The most common is of the erosive type and is characterized by one hyperemia of vaginal mucosa with secretion increase and presence of pain

and vagina ardency mainly of the vestibule. Vulva architecture is also kept in lichen planus despite of the erosions may produce vaginal sinequias.(ACOG , 2008)

The most adequate form to evaluate the presence of lichen sclerosis in its initial stages and differ it from other dermatosis is through the biopsy, despite of seldom presenting all histological characteristics in such a stage. (Regauer and cols, 2005; ACOG, 2008). The symptomatology of the lichen sclerosis is variable in intensity, being many times a disease of large extensions , but assymptomatic.) The lichen simplex chronicus is shown with intense itch with lichen in located areas, many times in places. (ACOG, 2008) The lichen sclerosus, in its largest part, is accompanied by important chronic itch, with attacking of all vulva skin and not only on a specific local in this skin. The handling of LS is important, due to its probable involvement with vulva malign pathology. Long dated studies evidencing the presence of lesions by lichen sclerosis in patients with vulva epidermoid carcinoma, have questioned this association with more evident hypotheses, as there was no possibility to determine if the oncogenesis would occur by chronic traumatism for scratching or would it be for chronic inflammatory infiltrated.

Previously denominated lichen sclerosis and atrophic this chronic illness is characterized. As already mentioned, by the progressive appearance of coalescentes white stains in all and any area of the body, with subsequent retraction of conjunctive tissue making the skin, fine, lisa and bright. Attacks both the sexes, adults and children, but one believes to be less frequent in the man (1:10), where is named balanitis xerotica et obliterans.

The presence of non neoplasic concomitant lesions in parts of vulvectomy seems to show clinic importance in the reevaluation and supervision of patients

who evidence vulva benign pathologies throughout their lives. Many studies have been made, aiming to correlate not only the presence of lichen sclerosus in non tumor skins in vulva carcinomas, but also the evolution of inflammatory alterations, to pre-neoplasic and neoplasics alterations,(Ansink and cols ,1994; Gomez Rueda and cols, 1994; Carlson and cols, 1998; Vilmer and cols, 1998). The presence of LE may be an important sign of risk in patients with chronic vulva itch while one cannot clearly determine the potentiality of the same in vulvar neoplasia (Franck and Young ,1995; Rolfe and cols, 2001)

There are authors who stress that lesion by lichen sclerosis would not present any risk in the beginning and, therefore its located and constant presence would be precursory of a leucoplasia, and this lesion, for sure would present in a long term basis, risk of malignancy(Locatelli and cols, 1983). The potential of lichen planus of malignity is already hardly discussed (Locatelli and cols, 1983; Punnonen and cols, 1985; Dwyer and cols 1995; Carlson and cols, 1998; Lewis, 1998) and the inflammatory and sclerosis alterations of LS are being considered by many authors in different studies. Some correlate the presence of LE with oncogenic potential to several cell modifications which may occur in some of these lesions. These modifications would be bound to p53 expression, mdm-2, Ki 67, the presence or absence of the infection by HPV, sort of inflammatory infiltrated presence in the tissue, unsteady genetic and angiogenic factors.

The lichen sclerosis has different expressions of p53 and mdm-2, what would point an evidence that the same acts as a lesion precursor in the absence of diverging cell (Carlson and cols, 2001). The overexpression of mdm-2 with stabilization or inactivation of p53 protein may be an alternative via to vulva

carcinogenesis. (Carlson and cols, 2001). Immunohystochemical study for evaluation of molecular markers in lichen sclerosus evidenced increase of the expression of p53 and Ki 67 in more hyperplasics areas and in the presence with the association with differentiated VIN (vulvar intraepithelial neoplasia) correlating them with subsequent evolution to epidermoid carcinoma(Rolfe and cols, 2001). The increase of p53 expression was meaningful in patients with lichen sclerosus and vulvar epidermoid carcinoma when compared to cancer .events without lichen associated as per researches by Carlson and cols (Carlson and cols – Human Pathol, 1998; Carlson and cols – Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001). Study led by Raspollini and cols (Raspollini and cols, 2007) made the pursuance of patients with LS diagnostic , and it was observed that those who evolved to cancer had meaningful statistically increase of the expression of Ki 67, cell proliferation marker, and of p53 regarding patients with stable lichen sickness without evolution to neoplasia.

The presence of HPV in samples of vulvectomy with or without lichen sclerosus may also be a reason for confusion in determining the oncogenic potentiality of LE alterations. The quantitative analysis of E6 protein of gene expression of HPV of p53 may help in the extension evaluation of surgical treatment in vulva carcinoma as well as a prognostic marker. The E6 protein of HPV is associated with suppression and degeneration of p53 protein, as shown in recent studies (Olejak and cols, 2001). Researches analyzing the presence of non-neoplasic epithelial alterations in events of vulva epidermoid carcinoma demonstrate associations between lichen sclerosus and the presence of HPV and

observed prognostic association according to the alteration type present (Ansink and cols, 1994; Lerma and cols, 1999).

The presence of non neoplasic epithelial alterations and multiple described by Gomez Rueda, and cols (Gomez Rueda and cols, 1994) evidences the presence of LE in only 9% of revised vulvectomy events, being a larger frequency in little differenced tumors. Ansink (Ansink and cols, 1994) evaluating the meaningful prognostic of HPV presence and of the lichen sclerosus in vulvar cancer events detected presence of 31.66% of LS and 53.33% of HPV, being the virus presence factor of better prognostic if compared to negative HPV patients and without reference to tumor type in the presence of lichen sclerosus. A prospective study followed a vulva lichen case for 11 years, being noticed evolution for moderate differences in 6 year period with evolution to invasive carcinoma 2 years later (Di Paola and cols, 1983). Hart and cols evidenced vulvar invasive epidermoid carcinoma coexisting in patients with vulva lichen sclerosus in 4.67% of the cases (n=107) and progression of LS to vulvar invasive carcinoma in 1.1% of the cases (n=92), in 12 year period (Hart and cols, 1975).

Carlson and cols followed up 32 cases of patients with vulva symptomatic lichen sclerosus and observed progression of 9% to VIN and 21% to epidermoid carcinoma in 4 years. (Carlson and cols, Human Pathology, 1998) A study held in East Melbourne, Australia, evidenced that more than 5% of the patients with vulva lichen sclerosis developed epidermoid carcinoma in a long term basis. (Scurry and Vanin, 1997). Derrick and cols. watched 21 patients with vulva carcinoma of epidermoid type and 2 with verrucosus carcinoma, where it was evidenced lichen sclerosus in 16 cases (69.5%) (Derrick and cols. 2000). In 108 patients with

epidermoid carcinoma at Institut Gustav Roussy were diagnosed 77 cases of adjacent epithelial alterations to the tumor, being 52 of them (48%) had lichen sclerosus. That study proved through the test of Cox proportional risk that the undifferentiated VIN presence(positive HPV) is a factor of better prognostic to the patient with vulva carcinoma and that patients without adjacent epithelial alterations to the tumor or with LE have alike prognostic less favorable (Rouzier and cols, 2001). The infection presence by HPV in patients who have lichen sclerosus may be a reason of confusion in the evolution evaluation to vulva squamous carcinoma. The vulvar intra epithelial neoplasia associated to lichen sclerosus can only be considered differentiated ones, is there's not concomitant HPV. Van Sters and cols in study held in 27 patients with lichen and VIN associated, without invader carcinoma found DNA of HPV in 31% of the lesions, observing that the VIN related to lichen sclerosus in the absence of invader carcinoma tends to be undifferentiated(Van Sters and cols, 2007) The inflammatory alterations promoted by lichen sclerosis are being evaluated by some researchers attempting to correlate the various types of inflammatories infiltrated with the carcinogenesis. In the lichen sclerosis there is epidermic infiltrated of CD37 + CD8+,CD57+ dermal infiltrated of CD8,+CD57+,HLA-DR+ (Carlson and cols 2000).The presence of CD8+, CD57+, HLA-DR+ and CD68+ (Carlson and cols 2000). The presence of CD8+, CD57+ and lymphocytes is associated with presence of virus infection, autoimmune diseases, malignancy and reaction in organ transplant. In these situations these cells participate in suppression of cytolitic activity to limit tissue damages. In lichen their presence does not show up clearly if we associate malignity, only determines the marked skin sclerosis as

significant as its presence.(Carlson and cols,2000). However, in the lichen sclerosus the number of T lymphocytes is a little bigger than the number of B lymphocytes, being T killers meaningfully in bigger number than T helper (Ben Hur and cols, 2001). The expressive increasing of T helper cells, B cells and IL-2 is demonstrated as one of the first signs of transformation of the inflammatory area in neoplasia (Ben Hur and cols, 2001).

In relation to genetic theory of the lichen sclerosis, Pinto and cooperators held a wide study of 57 epithelial loci of differentiated VINs or not (without HPV or with HPV), of LS and of epithelial hyperplasia without differences. From those, 31 epithelial loci were obtained from patients with positive association to vulva epidermoid carcinoma. It was identified alelic unbalance in all epithelial categories involving at least 1 locus cromossomic in 67% of the undifferentiated VIN, 53% of differenced VIN, 50% of hyperplasias and in 43% of lichen sclerosus. The presence of allelic unbalance in hyperplasic lesions and vulva lichen sclerosus led the authors to confirm their hypothesis that these alterations are risk factors to neoplasia despite of the absence of diverging cells. (Pinto and cols, 2000).

The study of angiogenic factors in malignant lesions and pre-malignant lesions evidenced that VEGF(vascular endothelial growing factor) is found in a minority of lesions by VIN and in most of vulvar cancers and PD-ECGF (endothelial cell growth factor platelet-derived) is found in most of all lesions. Based on this information the authors suggest that the angiogenic factors in ascending titles in any lesion type (including the ones of LS) could determine which would be the pre malign lesions with progression potential for invasive carcinoma. (MacLean and cols, 2000).

Other studies in individuals of male sex were effected in searching more precise information and to attempt to evaluate if the carcinogenic would be exclusively from female sex, with some type of hormonal involvement. The LS association with penis epidermoid carcinoma was perfectly characterized by some authors, with similar findings to researches in vulva, being these penis tumors rather differentiated and with transformation interval from lichen sclerosus to carcinoma in approximately 10 years (Nasca and cols, 1999; Powell and cols, 2001). Simonart and cols reported a patient ‘s case with penis lichen sclerosus which developed penis epidermoid carcinoma in the place of lichen lesions 20 years after the diagnostic of the benign disease. (Simonart and cols. 1998). Paricio and cols describe a case of penis carcinoma development, epidermoid type, occurred three years after LS diagnostic. (Paricio and cols, 1999). Nasca and cols observed malign transformation in 5.8% in cases of penis lichen sclerosus in 86 controlled cases, in 10 year revision, while Bouyssou-Gauthier and cols evidenced 6.4% of malign transformation in cases of penis lichen (n=16). (Bouyssou-Gauthier and cols, 1999; Nasca and cols, 1999). The histological behavior of vulvar tumors in comparison to penis ones in association with LS, determined to be variable according to the location. The vulva lichen sclerosus behaves in a different way of extra genital LS., inclusive of the intensity of histological alterations (Carlson and cols, 1998). In vulvectomy samples it was possible to evidence that histopathological variations occur in the same place depending on the distance of the tumor alteration: the nearest alterations to tumor areas are correlated with more differenced tumors, what doesn’t happen when the lichen sclerosus is found in farther areas from the tumor area (Scurry and cols, 2001).

In spite of so many studies suggesting an oncogenic outcome for the more frequent benign pathology of the vulva, the conduct before a lichen lesion is rather controversial. The treatment for the lichen sclerosis shows itself limited, and with a great deal of varied answers. For many years the treatment was recommended with testosterone dipropionate at 2% because of local alterations to be supposedly due to an inadequate hormonal producing. Comparative studies about testosterone dipropionate versus clobetasol dipropionate 0.05% evidenced a more effective answer through clobetasol, not only within a short period of time but also within a long term basis, without presenting disregards of treatment due to the failure of symptomatic improvement so common when using testosterone. (Bornstein and cols, 1998). Bornstein and cols evaluated the treatment within a short period of time (3 months) and within a long one (1 year) setting against the two mentioned treatments and have concluded that the symptomatic effect (subjective) of clobetasol was similar to that of testosterone within the first three months of following up ($p <$ or $=$ to 0.34), being the answer to signs and symptoms meaningfully better from the group in treatment with clobetasol until one year treatment ($p < 0.02$). In such a research one observed that 70% from the patients using testosterone, discontinued the treatment due to the answer lacuna after three months and only 10% of the women under clobetasol treatment, had interrupted the treatment for this reason ($p < 0.00042$). Due to this experience one concludes that clobetasol is more effective than testosterone mainly in a long term basis (Bornstein and cols, 1998). Even being the standard treatment, the efficiency and safety of clobetasol are constantly being studied, since there's a chance growth of the local symptoms getting worse and eventual infections for its constant use

(ACOG, 2008). Even if it is a potential topic corticotherapy , clinical tests evidenced that it remains as choice alternative very secure, cheap and efficient with possibility to be combined with emollient creams without putting in risk its efficacy. (Diakomanolis and cols, 2002; Simonart and cols, 2008). Hard cases reticent to the treatment were correlated in other studies such as greater risks cases to neoplasic evolution, or eventual infections, among them the HPV (Dahlman – Ghozian and cols, 1999). The presence of eosinophilic spongiosis**,** local lymphocitosis, persistent dermic eosinophilie foretell inefficient symptomatic answer. In studies among ISSVD specialists held by Departamento de Dermatologia do Hospital Ambroise Paré, a concordance of corticosteroid utilization as efficient treatment and necessary for lichen sclerosus was unanimous among the expert professionals in the area, however there is no agreement about the maintenance period of the same and neither which the first treatment is to be instituted.(Moyal – Barraco, 2001; ACOG, 2008). The appeal of the symptoms is the main factor for the treatment interruption, being the inclusion of softening medicines to the standard treatment with corticosteroids an auxiliary in the maintenance of a longer time of relief without compromising the efficacy, even it cuts back the exposition to topic steroid (Simonart and cols, 2008). Utilization of pimecrolimus at 1% is gradually being studied due to its non steroid action of selective inhibition of inflammatory cytokines**.** The results in lichen sclerosus and in lichen simplex chronicus demonstrate that there must be a longer relief time of the symptoms, being a good treatment alternative (Oskay and cols, 2007). Attempts of photodynamic therapy use after using aminolevulinic acid, without collateral effects with good results have

already been mentioned in the literature, but clobetasol remains as consensus by ISSVD.

Concluding, there's need for a bigger investigation in the area of vulva benign pathologies, particularly in lichen disease, not only as eventual entity involved in pathogenesis of vulva cancer but due to the multiple concomitant factors which may be obscuring the real determinants of carcinogenesis. As per various studies here exposed, the presence of lichen vulva lesion translates so rich other information about the immunological status, genetic and angiogenic of its carrier and that suffer dynamic changes in the course of its installation . The future detection of the eventual moment of carcinogenesis in lichen sclerosus, will allow us to act in a more decisive form in the prevention of vulva cancer.

At the present time the revised theories let out, while conclusive clinical data are missing, our intervention must keep on being palliative , observer and preventive, relieving the psychological and physical consequences (and perhaps oncogenic) that a non attention to this disease may cause to the individual who has it.

Justification for this research

The lichen sclerosus in the vulva presents an oncogenic behavior with approximately 5% of the diagnosed cases evolving to epidermoid carcinoma. The absence of specific markers which detect the risk of malign transformation demands that all carrying patients of this infirmity be constantly under evaluation of the vulva skin, attempting through the precocious diagnostic of malign transformation, to reduce the genital mutilation that the vulva carcinoma calls for in

its treatment. The identification of immunohystochemical markers which may cooperate in this evaluation, recognizing the risk patients, motivated the researchers to study the correlation of Ki 67 expression (cell proliferation) and of p53 (mutation)in the patients with diagnostic of vulva cancer with adjacent lichen disease.

Material and method

Revision of 47 anatomopathologic samples of vulvectomy by epidermoid carcinoma arising from Laboratorio de Patologia do Complexo Hospitalar Santa Casa – UFCSPA held in the period of 01/01/1993 to 12/31/07 with diagnostic of lichen sclerosus in adjacent skin of the tumor(epiderme slimming , reduction of epithelial digit form structure, collagen structure and inflammatory chronic infiltration), with realization of immunohystochemical study of these cases with research of ki 67 and p53 markers. These cases were confirmed through observation of two different pathologists, being only included the cases with mutual concordance in presence of adjacent lichen to the tumor (kappa index = 1). The paraffin blocks of these selected cases were cut at 5 micrometers thick and disparaffin blades in oven at 60° C fur thirty minutes. Then, they were submerses in xilol in two 5 minute stages, submitted to the concentration of 90% absolute alcohol, 70% and 50% and washed in distilled water. The antigenic recovery was effected through a solution of sodium citrate

(pH 6.0) in double boiling at 92° C for 40 minutes. The blocking of endogene peroxidase was held through two submerses with 10 minutes each in methanol solution more oxygen water with light protection. Unspecific connections were blocked with innocuous protein solution to the sample(Dako – Protein Block Serum – free). Afterwards the slides were incubated with primary antibodies(table) at 4° C.

Antibody	Clone	Supplier
Ki67	Monoclonal – Mib – 1	Dako
P53	Monoclonal – DO7	Dako

Markers research:

Ki67: nuclear antigen defined by ki67 monocional antibody expressed by proliferating cells during all the stages of cell cycle, except G-0. Its detection characterizes cell proliferation.

P53: the p53 oncogenic codifies a phosphoprotein with the purpose of keeping genoma integrity. The increasing of expression of this protein determined by the specific antibody is related to the presence of mutation in this gene.

The slides were incubated with a secondary biotinylated antibody for 40 minutes, washed in solution of phosphate (PBS), incubated in complex biotine-

peroxidase and again washed with PBS, to then be revealed with substract chromogen – diaminobenzidina (DAB). The counter coloration was made with hematoxilina. After dehydration, the slides were set with Entellan. Control slides were made for the antibodies. When ready, the slides were submitted to reading by a pathologist and the researcher with one auxiliary pathologist's help not involved with the project. The slides were examined in ten blown up microscope areas (400x) **.** As previously described the following cutting point to p53 in the reading was set up (Rolfe and cols, 2002):

1. Negative: until 10% of cells with their ruddy nucleus in the whole extension of tumor or of adjacent lichen.
2. Positive: over 10% of cells with their ruddy nucleus in the whole extension of tumor or in the adjacent lichen.

For the ki67 positivity analysis we used a cut-off of until 10% of diffused cell coloration as similar pattern to normal epithelia, being considered as low proliferative index (LPI).

Above 10% cells coloration we considered as high proliferative index (HPI). The cutt-off determination was selected by this research authors based on J Scurry's article (Scurry,J e cols, 1998) where was demonstrated that there isn't a determinant pattern of Ki 67 expression in normal skin, in lichen and in vulva carcinoma.

The analysis was made by two pathologists with concordance evaluation. In discordance of the analysis, the cases were revised again in group, with blade reading by two pathologists at the same time. The researcher on duty for the project followed all slides reading. After ending the reading, the results were submitted to the statistic analysis by 13 version SPSS program, utilizing Fisher non parametric test at a 5% significance level.

Inclusion criteria:

Only vulvectomy samples were held at CHSCPA in the period of 01/01/1993 to 12/31/2007 with adjacent skin to the tumor presenting lichen sclerosus. The material was previously selected after blade visualization by two pathologists with confirmation of lichen diagnostic (Kappa index = 1)

Exclusion criteria:

Samples which did not allow new cuttings or realization of immunohystochemical tests;

Samples originates from vulva biopsy or resections without enough skin in adjacent area to the tumor, for studying purposes.;

Cases with doubtful diagnostic of lichen;

Presence of other concomitant illnesses to lichen and carcinoma diagnostic, as for example, vulva intraepithelial neoplasia and condilomatose.

Ethics Committee in Research

This project was approved by the Ethics Committee in Research of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, on May 8, 2008 under statement number 615/08.

Results:

Among the expressions of the antibodies in tumor and in lichen one observed that there was no association between p53 expression in tumor and in adjacent lichen (p=0.063) – Table 1.

Through the exact Fisher test one evidenced association of tumor ki67 and ki67 expression in adjacent lichen, with 65.52% of positive cases for this marker in two lesions (p=0.001). Negative cases were also associated with a statistical significance. Table 2.

Between ki67 and p53 markers of isolated form, one observed that the expression presence of every one in tumor did not show association with the concomitant expression of the other, e.g. there was no evidence of association between tumor p53 and the tumor ki67 result (p=0.229). Table 3.

In adjacent lichen, however, one evidenced association of p53 positivity and ki67 positivity (p=0.006). Table 4

Table 1: p53 expression in tumor and in lichen (in number of cases)

	P53 positive lichen	P53 negative lichen	Total
P53 positive tumor	07 (77.78%)	15 (39.47%	22 (46.81%)
P53 negative tumor	02 (22.22%)	23 (60.53%)	25 (53.19%)
Total	09	38	47

Fisher test- table 1: p = 0.063

Table 2: ki67 expression in tumor and in lichen (in number of cases)

	Ki67 > 10% tumor (HPI)	Ki67 < 10% tumor (LPI)	Total
Ki67 HPI in lichen	**19 (65.52%)**	02 (11.11%)	21 (44.68%
Ki67 LPI in lichen	10 (34.48%	**16 (88.89%)**	26 (55.32%)
Total	29	18	47

Fisher test- table 2: p <0.001

Table 3: Tumor p53 expression x tumor ki67 expression (in number of cases)

	Ki67 HPI in tumor	Ki67 LPI in tumor	Total
P53 positive tumor	16 (55.17%)	06 (33.33%)	22 (46.81%)
P53 negative tumor	13 (44.83%)	12 (66.67%)	25 (53.19%)
Total	29	18	47

Fisher test- table 3: p = 0.229

Table 4: Lichen p53 expression x lichen ki67 expression (in number of cases)

	P53 positive lichen	P53 negative lichen	Total
Ki67 HPI in lichen	**08 (88.89%)**	13 (34.12%)	21 (44.68%)
Ki67 LPI in lichen	01 (11.11%)	25 (65.79%)	26 (55.32%)
Total	09	38	47

Fisher test: p = 0.006

Discussion

The progression of lichen sclerosis vulva alterations to vulva invasive carcinoma is still presented in a non fully clear form, being the search of markers for such an event a constancy in literature. This study evidenced the association of ki67 expression in invasive vulvar carcinoma and in adjacent lichen sclerosus, but did not evidence increase of p53 expression in the same cases. In invasive carcinomas, Ki 67 and p53 markers were studied as prognostic factors, evidencing their expression with tumor aggressiveness and a reduced survival if diffusely expressed (Salmaso and cols, 2002). In lichen sclerosus the studies that correlate ki67 and p53 positivity are presented with a few cases and diverging results. Tan and cols analyzed p53 expression in 10 cases of genital lichen sclerosus and set against the expression in 09 cases of non genital lichen (controls) and perceived increase of p53 expression in cases of vulva lichen sclerosus and ki67 low expression in relation to the controls (Tan and cols, 1994). Scurry and cols' study observed increased ki67 expression in basal cells and parabasal of lichen sclerosus with 50% positivity in lichen associated to vulva epidermoid carcinoma pointing out that there is a proliferative pattern of these cells in these conditions, though one can't affirm the lichen malign potentiality in this situation (Scurry and cols, 1998). Ki67 and p53 evaluation in similar cases to this study, however under the evolution follow-up to carcinoma performed by Raspollini and cols demonstrated an increased expression of ki67 in cases that evolved to carcinoma in relation to

those that were maintained without malign evidence. In this study p53 expression wasn't different in two groups of study, but due to the low number of cases (8 lichen cases with evolution to carcinoma and 8 lichen cases without evolution) the authors emphasize the necessity of special control for these patients and suggest more meaningful studies about the subject (Raspollini and cols, 2007)The results obtained from such a study are comparable to those of the literature, where the biggest positivity of ki67 in lichen sclerosus seems to have association with malignancy only in cases of genital lichen sclerosis. P53 expression which is more frequently found associated of lichen sclerosis and vulva carcinoma HPV positive, may have been prejudiced in its evaluation in the association, for one not having included the research for HPV. The presence of very old cases may have caused prejudice in the final results, as these parts weren't submitted to same today's fixing technique with formalina at 10%. The authors believe that this research with its results contribute for a higher attention to the immunohystochemicals markers in genital lichen sclerosis. In the aim of identifying patients with higher malign risk of vulva epithelial in the presence of lichen sclerosus it is necessary a larger number of studies. The correlation between ki67 marker expression in tumor and in adjacent lichen sclerosus cannot be affirmed in this study as a disease progression, but it stimulates wider search of connections between these two entities attempt to reduce cancer morbidity disease early treating these women.

Revisão da Literatura

O carcinoma da vulva representa 4% das neoplasias ginecológicas malignas, sendo a mais tardia (idade média de 65 anos) e por muito tempo associada a vários distúrbios clínicos, como por exemplo, diabete, HAS e obesidade. Ainda sem um fator etiológico determinado, muitos cofatores estão sendo estudados como implicações diretas ou indiretas no efeito carcinogênico, entre eles a presença de lesões ou distúrbios crônicos vulvares associados ao prurido. Entre as alterações epiteliais benignas vulvares que podem promover prurido, encontra-se o líquen escleroso (LE), que promove adelgaçamento e enrijecimento da pele vulvar, causando afinamento dos pequenos, grandes lábios e clitóris. O líquen escleroso é a mais comum das patologias benignas da vulva, sendo sua prevalência de 1:300 a 1:1000, com predileção pelas mulheres caucasianas entre 40 e 70 anos(Franck e Young (1995) ; Powell e Wojnarowska(1999)). Pode ocorrer em homens (balanite xerótica obliterante) e crianças (Franck e Young ,1995 ; Powell e Wojnarowska, 1999 ; Pelisse, 2001).A etiologia ainda é desconhecida e pode surgir em qualquer parte do corpo de forma lenta ,insidiosa e progressiva.(Crum,1996).As teorias para seu surgimento são várias, passando de doença auto-imune, infecciosa e até hormonal. As diversas hipóteses para etiopatogenia do LE buscam explicar se a estreita associação com o câncer vulvar estão correlacionadas com manifestações de doenças autoimunes , alterações genéticas, entre outras. Teorias de doença autoimune já

foram levantadas devido a portadoras de líquen vulvar possuírem anticorpos para doenças auto imunes em níveis mais elevados do que populações sem a doença - exemplo especial as tireoidopatias(Powell e Wojnarowska, 1999). O fenômeno de Koebner, que é a presença de líquen escleroso em áreas epiteliais traumatizadas ou lesadas sugerem que esta patologia possui predisposição tanto auto-imune quanto genética (Powell e Wojnarowska, 1999). Já foi investigada a Borrelia burgdorferi como possível agente etiológico infeccioso, porém os resultados não foram conclusivos. Baixos níveis de androstenediona e diidrotestosterona e diminuição da atividade da 5-alfa redutase foram mencionados em alguns trabalhos.(Rodrigues de Lima e cols, 1999).

Previamente denominada de líquen escleroso e atrófico esta doença crônica caracteriza-se, como já mencionado, pelo aparecimento progressivo de máculas brancas coalescentes em toda e qualquer área corporal , com subseqüente retração do tecido conjuntivo tornando a pele fina, lisa e brilhante. A lesão produzida pelo líquen traduz-se histologicamente por uma redução da estrutura digitiforme epitelial, colagenização e redução do componente elástico da pele. Ocorre um infiltrado celular do tipo inflamatório crônico, hiperceratose e total ausência de melanócitos produzindo aspecto clínico lesional atrófico, branco-nacarado. A análise citológica pode mostrar esfregaços ricos em células com paraceratose e hiperceratose, difíceis de diferenciar de outras lesões vulvares hiperplásicas(Kashimura e cols, 1993 ; Franck e Young, 1995; Van Hoeven e cols, 1997).

O líquen simples crônico é uma dermatose vulvar eczematosa que apresenta-se também muitas vezes com sinais e sintomas semelhantes ao

escleroso, sendo portanto diagnóstico diferencial importante. O líquen simples mostra-se clinicamente com áreas de hipopigmentação e adelgaçamento da pele e representa o estágio final de uma ampla variedade de agentes causais, sem, no entanto, apresentar-se com a progressiva perda da estrutura elástica da pele (sem mudança na anatomia vulvar) como o líquen escleroso determina. (ACOG, 2008). O líquen plano é outra dermatose inflamatória da mucosa genital e que apresenta-se de formas muito variadas. A mais comum é a do tipo erosivo e caracteriza-se por uma hiperemia da mucosa vaginal com aumento da secreção e presença de dor e ardência da vagina, principalmente do vestíbulo. A arquitetura da vulva também é mantida no líquen plano apesar das erosões produzirem sinéquias vaginais (ACOG, 2008).

A forma mais adequada de avaliar a presença de líquen escleroso em seus estágios iniciais e diferenciá-lo de outras dermatoses é através da biópsia, apesar de raramente apresentar todas as características histológicas nesta fase. (Regauer e cols, 2005; ACOG, 2008). A sintomatologia do líquen escleroso é variável em intensidade, sendo muitas vezes uma doença de grandes extensões, porém, assintomáticas . O líquen simples crônico apresenta-se com prurido intenso com liquenificação em áreas localizadas, muitas vezes em placa. (ACOG, 2008). O líquen escleroso, em sua maior parte, é acompanhado de prurido crônico importante, com acometimento de toda pele vulvar e não apenas de um local específico nesta pele. O manejo do LE é importante devido ao seu provável envolvimento com a patologia maligna da vulva. Estudos mais antigos evidenciando a presença de lesões por líquen escleroso em pacientes com carcinoma epidermóide vulvar questionaram esta associação formulando algumas

hipóteses a fim de determinar se a oncogênese ocorreria por traumatismo crônico do ato de coçar ou se seria decorrente do infiltrado inflamatório crônico.

A presença de lesões não neoplásicas concomitantes em peças de vulvectomia parece apresentar importância clínica na reavaliação e no acompanhamento de pacientes que evidenciem patologias benignas vulvares no decorrer de suas vidas. Muitos estudos já foram realizados objetivando correlacionar não somente a presença do líquen escleroso em pele não tumoral em carcinomas vulvares, mas também a evolução das alterações inflamatórias para alterações pré-neoplásicas e neoplásicas (Ansink e cols 1994; Gomez Rueda e cols,1994; Carlson e cols 1998; Vilmer e cols, 1998). A presença de alterações epiteliais não neoplásicas e múltiplas descritas por Gómez Rueda, et al (Gomez Rueda e cols, 1994) evidencia a presença do LE em apenas 9% dos casos de vulvectomias revisadas, sendo uma maior freqüência de lesões em tumores pouco diferenciados. Um estudo prospectivo acompanhou 1 caso de líquen vulvar por 11 anos sendo observado evolução para atipias moderadas no período de 6 anos com evolução para carcinoma invasor 2 anos após (Di Paola e cols, 1983). Hart e cols evidenciaram carcinoma epidermóide invasor vulvar coexistente em pacientes com líquen escleroso vulvar em 4,67% dos casos (n=107) e a progressão de LE para carcinoma invasor vulvar em 1,1% dos casos (n=92), no período de 12 anos (Hart e cols 1975) . Carlson e colaboradores acompanharam 32 casos de pacientes com líquen escleroso sintomático vulvar e observaram progressão de 9% para VIN e 21% para carcinoma epidermóide em 4 anos. (Carlson e cols, Human Pathology, 1998) . Um estudo feito em East Melbourne, na Austrália evidenciou que mais de 5% das pacientes com líquen

escleroso vulvar desenvolveram carcinoma epidermóide a longo prazo. (Scurry e Vanin, 1997). Derrick e cols. estudaram 21 pacientes com carcinoma vulvar do tipo epidermóide e 2 com carcinoma verrucoso, onde foi evidenciado líquen escleroso em 16 casos (69,5%)(Derrick e cols, 2000). A presença de LE parece ser, portanto, um sinal importante de risco em pacientes com prurido vulvar crônico enquanto ainda não se pode determinar claramente o potencial do mesmo na patologia neoplásica vulvar (Franck e Young, 1995; Rolfe e cols, 2001).

Há autores que defendem que a lesão pelo líquen escleroso não apresentaria nenhum risco inicial e, portanto, sua presença constante e localizada seria precursora de uma leucoplasia , sendo que esta lesão sim , apresentaria a longo prazo, risco de malignização (Locatelli e cols, 1983). O potencial de malignização do líquen plano já é bastante conhecido e discutido(Locatelli e cols, 1983; Punnonen e cols,1985; Dwyer e cols, 1995; Carlson e cols, 1998; Lewis, 1998) e as alterações inflamatórias e esclerosantes do LE vem sendo consideradas por muitos autores em diferentes estudos. Alguns correlacionam a presença de LE com potencial oncogênico às inúmeras alterações celulares que podem ocorrer em algumas destas lesões. Estas modificações das células epiteliais estariam ligadas a expressão da p53, mdm-2, Ki 67, presença ou ausência da infecção pelo HPV,tipo de infiltrado inflamatório presente no tecido, desequilíbrio genético e fatores angiogênicos .

O líquen escleroso possui diferentes expressões do p53 e do mdm-2, o que apontaria uma evidência de que o mesmo atua como um precursor de lesão na ausência de atipias celulares (Carlson e cols, 2001). A superexpressão do mdm-2 com estabilização ou inativação da proteína p53 pode ser uma via

alternativa para a carcinogênese vulvar (Carlson e cols, 2001). Estudo imunoistoquimico para avaliação de marcadores moleculares no líquen escleroso evidenciou aumento da expressão de p53 e Ki 67 em áreas mais hiperplásicas e na presença da associação com VIN diferenciada, correlacionando-as com subseqüente evolução para carcinoma epidermóide (Rolfe e cols, 2001). O aumento da expressão do p53 foi significativa em pacientes com líquen escleroso e carcinoma epidermóide vulvar quando comparada a casos de câncer sem líquen associado conforme as pesquisas de Carlson e cols (Carlson e cols- Human Pathol,1998; Carlson e cols – Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001). Estudo conduzido por Raspollini et al (Raspollini e cols, 2007) fez o seguimento de pacientes com diagnóstico de LE , observando-se que as que evoluíram para câncer tinham aumento estatisticamente significativo da expressão do ki 67, marcador de proliferação celular, e do p53 em relação às pacientes com doença liquenóide estável sem evolução para neoplasia.

A presença de infecção pelo vírus HPV em pacientes portadoras de líquen escleroso pode ser fator de confusão na avaliação da evolução para carcinoma escamoso vulvar. As neoplasias intraepiteliais vulvares associadas com o líquen escleroso somente podem ser consideradas como diferenciadas se não houver HPV concomitante. Van Sters e cols em estudo realizado com 27 pacientes com líquen e VIN associada, sem carcinoma invasor encontraram DNA do HPV em 31% das lesões, observando que a VIN relacionada ao líquen escleroso na ausência do carcinoma invasor tende a ser indiferenciada (Van Seters e cols, 2007). A análise quantitativa da proteína E6 do HPV da expressão gênica da p53 pode ser útil na avaliação da extensão do tratamento cirúrgico no

carcinoma vulvar bem como um marcador prognóstico. A proteína E6 do HPV está associada com supressão e degradação da proteína p53, como demonstram estudos recentes (Olejak e cols, 2001). Pesquisas analisando a presença alterações epiteliais não-neoplásicas em casos de carcinoma epidermóide vulvar demonstraram associações entre líquen escleroso e a presença de HPV e observaram associação prognóstica conforme o tipo de alteração presente (Ansink e cols , 1994; Lerma e cols, 1999). Ansink et al (Ansink e cols, 1994) avaliando o significado prognóstico da presença do HPV e do líquen escleroso em casos de câncer vulvar detectou presença de 31,66% de LE e 53,33% de HPV , sendo a presença viral fator de melhor prognóstico se comparado as pacientes HPV negativas e sem referência ao tipo tumoral na presença de líquen escleroso. Em 108 pacientes com carcinoma epidermóide no Institut Gustav Roussy foram diagnosticadas 77 casos de alterações epiteliais adjacentes ao tumor , sendo que 52 delas (48%) apresentavam líquen escleroso. Esse estudo comprovou pelo teste de risco proporcional de Cox que a presença da VIN indiferenciada (HPV positivo) é um fator de melhor prognóstico para a paciente com carcinoma vulvar e que pacientes sem alterações epiteliais adjacentes ao tumor ou com LE possuem prognóstico semelhante menos favorável (Rouzier e cols, 2001).

As alterações inflamatórias promovidas pelo líquen escleroso vem sendo avaliadas por alguns pesquisadores na tentativa de correlacionar os vários tipos de infiltrados inflamatórios com a carcinogênese. No LE há infiltrado epidérmico de CD 37+, CD8+, CD 57+ e infiltrado dérmico de CD8+, CD57+, HLA-DR+ e CD68+ (Carlson e cols 2000). A presença de CD8+, CD57+ e linfócitos está associado com presença de infecção viral, doenças auto-imunes, malignidade

e transplante de órgãos. Nessas situações estas células participam na supressão da atividade citolítica para limitar danos teciduais. No líquen escleroso o infiltrado inflamatório parece apenas determinar a marcada esclerose da pele quanto maior sua presença, sem existir uma associação clara com a transformação maligna da lesão. (Carlson e cols, 2000). O desenvolvimento do tumor vulvar, entretanto, é manifestado com profundas alterações nas relações entre os diferentes componentes linfóides, conforme estudo de Ben –Hur e cols (Bem Hur e cols, 2001). No líquen escleroso o número de linfócitos T é um pouco maior do que o número de linfócitos B, sendo as T killers significativamente em maior número que as T helper (Bem Hur e cols, 2001). O aumento expressivo de células T helper, células B e IL-2 demonstra-se como um dos primeiros sinais de transformação da área inflamatória em neoplasia (Ben Hur e cols, 2001).

Em relação a teoria genética do líquen escleroso, Pinto e colaboradores realizaram amplo estudo de 57 loci epiteliais de VINs diferenciadas (HPV negativas) ou não (VIN indiferenciadas, HPV positivas), de LE e de hiperplasia epitelial sem atipias. Destes, 31 loci epiteliais foram obtidos de pacientes com associação positiva para carcinoma epidermóide vulvar. Foi identificado desequilíbrio alélico em todas as categorias epiteliais envolvendo pelo menos 1 locus cromossômico em 67% das VIN indiferenciadas, 53% das VIN diferenciadas, 50% da hiperplasias e em 43 % dos líquens esclerosos. A presença de desequilíbrio alélico em lesões hiperplásicas e líquen escleroso vulvar levaram os autores a confirmar sua hipótese de que estas alterações são fatores de risco para neoplasia apesar da ausência de atipias celulares. (Pinto e cols, 2000).

O estudo de fatores angiogênicos em lesões malignas, pré-malignas vulvares evidenciou que o fator VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) é encontrado em uma minoria de lesões por VIN e na maioria dos cânceres vulvares e o fator PD-ECGF (fator de crescimento endotelial derivados de plaquetas)é encontrado na maioria de todas as lesões. Com base nestas informações os autores sugerem que fatores angiogênicos em títulos ascendentes em qualquer tipo de lesão (incluindo as de LE) poderiam determinar quais seriam as lesões pré-malignas com potencial progressão para carcinoma invasor. (MacLean e cols, 2000).

Estudos com indivíduos do sexo masculino foram efetuados na busca de informações mais precisas e para tentar avaliar se o potencial carcinogênico do LE seria exclusivo do sexo feminino, com algum tipo de envolvimento hormonal. A associação LE com carcinoma epidermóide peniano foi bem caracterizada por alguns autores, com achados semelhantes às pesquisas em vulva, sendo estes tumores penianos de tipo bem diferenciado e com intervalo de transformação de líquen escleroso para carcinoma de aproximadamente 10 anos (Nasca e cols, 1999; Powell e cols, 2001). Simonart e colaboradores relataram caso de um paciente com líquen escleroso peniano que desenvolveu carcinoma epidermóide de pênis no local das lesões liquenóides 20 anos após o diagnóstico da patologia benigna. (Simonart e cols, 1998). Paricio e colaboradores descrevem 1 caso de desenvolvimento de carcinoma peniano, tipo epidermóide, ocorrido 3 anos após diagnóstico de LE. (Paricio e cols, 1999). Nasca e cols observaram transformação maligna em 5,8% do casos de líquen escleroso peniano em 86 casos acompanhados , em revisão de 10 anos,

enquanto Bouyssou-Gauthier e cols evidenciaram 6,4% de transformação maligna nos casos de líquen peniano (n=16). (Bouyssou-Gauthier e cols, 1999; Nasca e cols, 1999) O comportamento histológico dos tumores vulvares em comparação com os penianos em associação com o LE, determinou ser variável de acordo com a localização. O líquen escleroso vulvar comporta-se de maneira diferente do LE extragenital., inclusive na intensidade das alterações histológicas (Carlson e cols, 1998). Em peças de vulvectomia foi possível evidenciar que ocorrem variações histopatológicas dentro de um mesmo local dependendo da distância da alteração tumoral: as alterações mais próximas às áreas tumorais estão correlacionadas com tumores mais diferenciados o que não ocorre quando o líquen escleroso é encontrado em áreas mais distantes da área tumoral (Scurry e cols, 2001).

Apesar de tantos estudos sugerindo um desfecho oncogênico para a patologia benigna mais freqüente da vulva, a conduta perante uma lesão liquenóide é bastante controversa. O tratamento para o líquen escleroso demonstra- se limitado, e com respostas bastante variadas. Por muitos anos o tratamento foi instituído com dipropionato de testosterona a 2% em razão das alterações locais serem supostamente devidas a uma resposta inadequada aos hormônios circulantes. Estudos comparativos sobre o dipropionato de testosterona versus o dipropionato de clobetasol 0,05% envidenciam uma resposta mais efetiva através do clobetasol, tanto a curto quanto a longo prazo, sem apresentar abandonos de tratamento devido a falha de melhora sintomática tão comuns com a testosterona. (Bornstein e cols, 1998) . Bornstein e cols avaliaram tratamento a curto (3 meses) e longo prazo (1 ano) comparando os dois tratamentos citados

e concluíram que o efeito sintomático (subjetivo) do clobetasol foi similar ao da testosterona nos primeiros 3 meses de follow up (p < ou = a 0,34), sendo a resposta aos sinais e sintomas significativamente melhor do grupo em tratamento com clobetasol até um ano de tratamento (p< 0,02). Nessa pesquisa observou-se que 70% das pacientes usando testosterona descontinuaram o tratamento devido a lacuna de resposta após 3 meses sendo que apenas 10% das mulheres tratadas com clobetasol haviam abandonado o tratamento por esta razão (p< 0,00042). Devido a esse trabalho concluiu-se que o clobetasol é mais efetivo que a testosterona principalmente a longo prazo (Bornstein e cols, 1998). Mesmo sendo o tratamento padrão,a eficácia e a segurança do clobetasol vem sendo constantemente estudadas pois há aumento de chance de piora dos sintomas locais e infecções oportunistas pelo seu uso continuado (ACOG, 2008). Ainda que seja um corticóide tópico potente, ensaios clínicos evidenciam que permanece como alternativa de escolha bastante segura, barata e eficaz, com possibilidade de associação com cremes emolientes sem comprometimento de sua eficácia. (Diakomanolis e cols, 2002; Simonart e cols, 2008). Casos difíceis, reticentes ao tratamento foram correlacionados em outros estudos como casos de maior risco para evolução neoplásica, ou de infecções oportunísticas, entre elas o HPV (Dahlman- Ghozlan e cols, 1999). A presença de espongiose eosinofílica, linfocitose local, eosinofilia dérmica persistente predizem resposta sintomática deficiente . Em estudos entre especialistas da ISSVD realizada pelo Departamento de Dermatologia do Hospital Ambroise Paré, a concordância da utilização de corticosteróide como tratamento eficaz e necessário para o líquen escleroso foi unânime entre os profissionais *experts* na área, porém não há concordância no

período de manutenção do mesmo e nem qual o primeiro tratamento a ser instituído.(Moyal- Barraco, 2001; ACOG, 2008). A recorrência dos sintomas é o principal fator de abandono do tratamento, sendo a inclusão de emolientes ao tratamento padrão com corticosteróides um auxiliar na manutenção de um tempo maior de alívio sem comprometer a eficácia, ainda que reduza a exposição ao esteróide tópico (Simonart e cols, 2008). A utilização de pimecrolimus a 1% vem sendo cada vez mas estudada devido a sua ação não esteróide de inibição seletiva das citoquinas inflamatórias. Os resultados no líquen escleroso e no líquen simples crônico demonstram que parece haver um tempo maior de alívio dos sintomas, sendo uma boa alternativa de tratamento (Oskay e cols, 2007). Tentativas de uso de terapia fotodinâmica após uso de ácido aminolevulínico, sem efeitos colaterais com bons resultados já foram citados na literatura , porém o clobetasol permanece como consenso pela ISSVD.

Concluindo, há uma necessidade de maior investigação na área das patologias benignas vulvares, em particular da doença liquenóide, não tão somente como provável entidade envolvida na patogênese do câncer vulvar mas devido aos múltiplos fatores concomitantes que podem estar obscurecendo os verdadeiros determinantes da carcinogênese.Conforme os muitos estudos aqui expostos, a presença da lesão vulvar liquenóide traduz uma riqueza de outras informações sobre o status imunológico, genético e angiogênico do seu portador e que sofrem mudanças dinâmicas no decorrer de sua instalação. A detecção futura do provável momento da carcinogênese no líquen escleroso, nos permitirá atuar de forma mais decisiva na prevenção do câncer vulvar . No presente momento, as teorias revisadas revelam que, enquanto nos faltam dados clínicos

conclusivos, nossa intervenção deve continuar sendo paliativa , observadora e preventiva , aliviando as seqüelas físicas e psicológicas (e talvez oncogênicas) que a não atenção a esta doença pode acarretar ao indivíduo que a apresenta.

JUSTIFICATIVA

O líquen escleroso na vulva apresenta um comportamento oncogênico com aproximadamente 5% dos casos diagnosticados evoluindo para carcinoma epidermóide. A ausência de marcadores específicos que detectem o risco de transformação maligna exige que todas as pacientes portadoras desta enfermidade estejam em constante avaliação da pele vulvar tentando-se, através do diagnóstico precoce da transformação maligna, diminuir a mutilação genital que o carcinoma da vulva exige em seu tratamento. A identificação de marcadores imunoistoquímicos que possam colaborar nesta avaliação, reconhecendo as pacientes de risco, motivou os pesquisadores a estudarem a correlação da expressão do ki 67 (proliferação celular) e do p53 (mutação) nas pacientes com diagnóstico de câncer vulvar com a doença líquen adjacente.

Material e método

Revisão das 47 peças anatomopatológicas de vulvectomia por carcinoma epidermóide provenientes do Laboratório de Patologia do Complexo Hospitalar Santa Casa - UFCSPA realizadas no período de 01/01/1993 a

31/12/07 com diagnóstico de líquen escleroso em pele adjacente ao tumor (adelgaçamento da epiderme, redução da estrutura digitiforme epitelial, colagenização e infiltrado inflamatório crônico), com realização de estudo imunoistoquímico destes casos com pesquisa dos marcadores ki 67 e p53. Estes casos foram confirmados pela observação de dois patologistas diferentes, sendo incluídos apenas os casos com concordância de ambos da presença de líquen adjacente ao tumor (índice kappa=1). Os blocos de parafina destes casos selecionados foram cortados com espessura de 5 micrômetros e as lâminas desparafinadas em estufa a 60º C por 30 minutos. Após, foram então submersas em xilol em duas etapas de cinco minutos, submetidas a concentrações de álcool absoluto 90%, 70% e 50% e lavadas em água destilada. A recuperação antigênica foi feita através de uma solução de citrato de sódio (pH 6,0) em banho Maria a 92º C durante 40 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através de duas submersões com 10 minutos cada em solução de metanol mais água oxigenada com proteção da luz. Ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução de proteína inócua à amostra (Dako – Protein Block Serum-free). Após, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (tabela) a 4º C.

Anticorpo	*Clone*	Fornecedor
Ki67	Monoclonal – Mib-1	Dako
P53	Monoclonal – DO7	Dako

Pesquisa dos marcadores:

Ki 67: antígeno nuclear definido por um anticorpo monoclonal Ki67 expresso por células proliferantes durante todas as fases do ciclo celular, exceto G-0. Sua detecção caracteriza proliferação celular.

P53: o oncogene p53 codifica uma fosfoproteína com a função de manter a integridade do genoma. O aumento da expressão desta proteína determinada pelo anticorpo específico está relacionada a presença de mutação neste gene.

As lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado por 40 minutos, lavadas em solução de tampão fosfato (PBS), incubadas em complexo biotina–peroxidase e novamente lavadas com PBS, para então serem reveladas com substrato cromógeno - diaminobenzidina (DAB). A contracoloração foi realizada com hematoxilina. Após desidratação, as laminas foram montadas com Entellan®. Foram feitas lâminas controle para os anticorpos. Após prontas, as lâminas foram submetidas a leitura pelo patologista co-orientador e a pesquisadora com auxílio de um patologista auxiliar não envolvido com o projeto. As lâminas foram lidas em dez campos microscópicos de grande aumento (400 x) . Conforme já descrito previamente o seguinte ponto de corte na leitura para p53 foi determinado (Rolfe e cols, 2002):

1) negativo: até 10% das células com seus núcleos corados em toda a extensão do tumor ou do líquen adjacente.
2) Positivo: acima de 10% das células com seus núcleos corados em toda extensão do tumor ou no líquen adjacente.

Para a análise da positividade de ki67 utilizamos o ponto de corte de até 10% de coloração difusa das células como padrão semelhante ao epitélio normal, sendo considerado como baixo índice proliferativo (BIP).

Acima de 10% de coloração das células foi considerado como alto índice proliferativo (AIP). A determinação do ponto de corte escolhido para os autores deste trabalho foi baseado em artigo de J Scurry (Scurry J e cols, 1998) onde os autores demonstram que não há um padrão determinado de expressão do marcador ki 67 na pele normal, no líquen e no carcinoma vulvar.

A análise foi feita por dois patologistas com avaliação da concordância. Na discordância das análises, os casos foram revisados novamente em conjunto, com leitura das lâminas por dois patologistas em mesmo momento. A pesquisadora responsável pelo projeto acompanhou a leitura de todas as lâminas.

Após término da leitura os resultados foram submetidos a análise estatística pelo programa SPSS versão 13, utilizando-se o teste não-paramétrico de Fisher com nível de significância de 5% .

Critérios de inclusão:

- Foram estudadas apenas peças de vulvectomia com ou sem linfadenectomia realizadas no CHSCPA no período de 01/01/93 a 31/12/07 com pele adjacente ao tumor apresentando líquen escleroso. O material foi previamente selecionado após visualização das lâminas por dois patologistas com confirmação do diagnóstico de líquen (Índice Kappa=1).

Critérios de exclusão:

- Peças que não permitiram novos cortes ou realização de imunoistoquímica

- Peças provenientes de biópsias da vulva ou ressecções sem pele suficiente em área adjacente ao tumor para estudo.
- Lâminas com diagnóstico duvidoso de líquen.
- Presença de outras doenças concomitantes ao diagnóstico de líquen e carcinoma , como por exemplo, neoplasia intraepitelial vulvar e condilomatose

Amostra:

Amostra selecionada por julgamento (amostra não-probabilística, por conveniência).

Não foi possível realizar um cálculo de amostra específico para este estudo devido a não existir na bibliografia consultada dado referente a variância da positividade dos marcadores estudados. O câncer da vulva perfaz 4% dos cânceres ginecológicos e a presença do líquen escleroso associado oscila em torno de 15% a 30%. A revisão dos estudos já realizados sobre o assunto permitiu observar análises de até 30 a 40 casos (com estudos de 16 até 108 casos) e resultado com significância estatística. A pesquisa será realizada, portanto, com o número de casos disponíveis em nosso laboratório de patologia que, após a busca de todos casos com os critérios de inclusão , chegou a um tamanho amostral igual a 47.

n total = 47 casos

Orçamento

Todos os custos foram arcados pela pesquisadora e pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Termo de Confidencialidade

Não foi aplicado o Termo de Consentimento, pois todo o material utilizado é proveniente de exames anatomopatológicos obtidos durante o tratamento das pacientes do Complexo Hospitalar Santa Casa e que estão armazenados no arquivo da Patologia deste mesmo hospital . No intuito de tratar as pacientes em sua dignidade, respeitando sua autonomia e defendê-las em sua vulnerabilidade, todos os dados serão tratados de forma confidencial, obedecendo ao item *g)* da CNS 196/96 e ao item 7 do Parecer 151-06 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Será firmado o "Termo de Confidencialidade de Dados" do Complexo Hospitalar Santa Casa. Os resultados deste trabalho não vão influenciar e nem influenciaram o tratamento recebido pelas pacientes, quando da realização dos exames aqui estudados. Os blocos de parafina selecionados para análise serão devidamente armazenados no laboratório de imunopatologia com responsabilidade da pesquisadora pelo devido retorno dos mesmos ao Laboratório de Patologia após o término da pesquisa.

Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre em 08 de maio de 2008 com parecer de número 615/08.

Resultados:

Entre as expressões dos anticorpos no tumor e no líquen observou-se que não houve associação entre a expressão do p53 no tumor e no líquen adjacente (p=0,063)- Tabela 1.

Pelo teste exato de Fisher evidenciou-se associação da expressão do ki67 tumoral e a expressão do ki 67 no líquen adjacente, com 65,52% dos casos com alto índice proliferativo (AIP) para este marcador nas duas lesões (p=0,001). Observou-se também associação estatisticamente significativa nos casos com baixo índice de proliferação do marcador - Tabela 2.

Entre os marcadores ki67 e p53 de forma isolada, observou-se que a presença de expressão de cada um no tumor não apresentou associação com a expressão concomitante do outro, ou seja, não houve evidência de associação entre o resultado do p53 tumoral e o resultado do ki67 tumoral (p=0,229).Tabela 3.

No líquen adjacente, entretanto, evidenciou-se associação da positividade de p53 com o alto índice proliferativo do ki 67 (p=0,006). Tabela 4

Tabela 1: Associação da Expressão do p53 no tumor e no líquen (em número de casos)

	P53 líquen positivo	P53 líquen negativo	Total
P53 tumor positivo	07 (77,78%)	15 (39,47%)	22 (46,81%)
P53 tumor negativo	02 (22,22%)	23 (60,53%)	25 (53,19%)
Total	09	38	47

Teste de Fisher tabela 1: p = 0,063

Tabela 2: Associação da Expressão do ki67 no tumor e no líquen (em número de casos)

	Ki67tumor com AIP	Ki67 tumor com BIP	Total
Ki67 líquen com AIP	**19 (65,52%)**	02 (11,11%)	21 (44,68%)
Ki67 líquen com BIP	10 (34,48%)	16 (88,89%)	26 (55,32%)
Total	2	18	47

Teste de Fisher tabela 2: p<0,001

Tabela 3: Associação da Expressão do p53 tumoral x Expressão do ki67 tumoral (em número de casos)

	Ki67 tumor AIP	Ki67 tumor BIP	Total
P53 tumor positivo	16 (55,17%)	06 (33,33%)	22 (46,81%)
P53 tumor negativo	13 (44,83%)	12 (66,67%)	25 (53,19%)
Total	29	18	47

Teste de Fisher tabela 3: p= 0,229

Tabela 4: Associação da Expressão do p53 líquen x Expressão do ki67 no líquen (em número de casos)

	P53 líquen positivo	P53 líquen negativo	Total
Ki67 líquen AIP	**08 (88,89%)**	13 (34,12%)	21 (44,68%)
Ki67 líquen BIP	01 (11,11%)	25 (65,79%)	26 (55,32%)
Total	09	38	47

Teste de Fisher: p = 0,006

Discussão

A progressão das alterações vulvares do líquen escleroso para carcinoma invasor da vulva apresenta-se ainda de forma não totalmente clara sendo a busca de marcadores para este evento uma constante na literatura. Este estudo evidenciou associação da expressão do ki 67 no carcinoma invasor e no líquen escleroso adjacente porém não evidenciou aumento da expressão da p53 nos mesmos casos. Nos carcinomas invasores, os marcadores ki67 e p53 foram estudados como fatores prognósticos, evidenciando sua expressão com agressividade tumoral e uma sobrevida diminuída se difusamente expressos (Salmaso e cols, 2002). No líquen escleroso os estudos que correlacionam a positividade de ki-67 e p53 apresentam-se com poucos casos e resultados divergentes. Tan e cols analisaram a expressão do p53 em 10 casos de líquen escleroso genital e compararam com a expressão em 09 casos de líquen não genital (controles) e perceberam aumento da expressão da p53 nos casos de líquen escleroso vulvar e uma baixa expressão de ki 67 em relação aos controles

(Tan e cols, 1994). O estudo de Scurry e cols observou expressão aumentada de ki 67 em células basais e parabasais do líquen escleroso com 50% de positividade no líquen associado ao carcinoma epidermóide vulvar indicando que há um padrão proliferativo destas células nestas condições, embora não seja possível afirmar o potencial de malignização do líquen nesta situação (Scurry e cols, 1998). A avaliação do ki 67 e da p53 em casos semelhantes ao deste estudo porém com acompanhamento da evolução para carcinoma feita por Raspollini e cols demonstrou uma expressão aumentada de ki67 em casos que evoluíram para carcinoma em relação aos que se mantiveram sem evidência de malignização. Nesse estudo a expressão da p53 não foi diferente nos dois grupos em estudo, mas devido ao número muito pequeno de casos (8 casos de líquen com evolução para carcinoma e 8 casos de líquen sem evolução) os autores salientam a necessidade do controle especial destas pacientes e sugerem estudos maiores sobre o assunto (Raspollini e cols, 2007). Os resultados obtidos com este estudo são comparáveis aos da literatura, onde a maior positividade de ki 67 no líquen escleroso parece ter associação com a malignização. A expressão de p53 que encontra-se mais frequentemente associada a casos de líquen escleroso e carcinoma vulvar HPV positivos, pode ter sido prejudicada em sua avaliação na associação por não incluirmos neste estudo a pesquisa para HPV. A presença de casos muito antigos pode ter causado prejuízo nos resultados finais pois estas peças não eram submetidas a mesma técnica de fixação atual com formalina a 10%. Os autores acreditam que essa pesquisa contribui com seus resultados para a maior atenção aos marcadores imunoistoquímicos no líquen escleroso genital. No intuito de identificar pacientes com maior risco de malignização do epitélio

vulvar na presença de líquen escleroso é necessário um número maior de estudos. A correlação entre a expressão do marcador ki 67 no tumor e no líquen escleroso adjacente não pode ser afirmada neste estudo como uma transformação da doença benigna em maligna porém estimula maior busca de conexões entre estas duas entidades. O momento e o motivo da transformação maligna da pele com LE é ainda algo desconhecido e necessita maior investigação . Pode ser que, descobrindo como ocorre esta transformação possamos diminuir a morbidade e a mutilação da doença câncer vulvar, tratando precocemente essas mulheres.

Referências:

ACOG Practice Bulletin N.o 93:diagnosis and management of vulvar skin disorders. Obstet Gynecol. 2008 May; 111(5): 1243-53.

Ansink AC, krul MR, De Weger RA, Kleyne JA, Pijpers H, Van Tinteren H, De Kraker EW, Helmerhorst TJ, Heintz AP. Human papillomavirus, lichen sclerosus, and squamous cell carcinoma of the vulva: detection and prognostic significance.Gynecol Oncol 1994 Feb; 52 (2):180-4

Ben-Hur H, Ashkenazi M, Huszar M, Gurevich P, zusman I. Lymphoid elements and apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, p53 and bcl2) in lichen sclerosus and carcinoma of the vulva. Eur J Gynaecol Oncol 2001; 22(2): 104-9.

Bornstein J, Heifetz S, Kellner Y, Stolar Z, Abramovici H. Clobetasol dipropionate 0.05% versus testosterone propionate 2% topical application for severe vulvar lichen sclerosus. Am J Obstet Gynecol 1998 Jan;178(1Pt1):80-4.

Bouyssou-Gauthier Ml, Boulinguez S, Dumas JP, Bedane C, Bonnetblane JM. Penile lichen sclerosus: follow up study. Ann Dermatol Venereol 1999 Nov; 126 (11):804-7.

Breisky A. Über Kraurosis vulvae. Z Heilkr 1885; 6: 69

Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, Figge H, Mihm MC Jr. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. Hum Pathol. 1998 Sep;29(9):932-48

Carlson JA, Lamb P, Malfetano J, Ambros RA, Mihm MC Jr. Clinicopathologic comparison of vulvar and extragenital lichen sclerosus: histologic variant, evolving lesions, and etiology of 141 cases.Mod Pathol 1998 sep; 11(9):844-54.

Carlson JA, Grabowski R, Chichester P, Paunovich E, Malfetano J. Comparative immunophenotypic study of lichen sclerosus: epidermotropic CD 57+ lymphocytes are numerous-implication for pathogenesis.Am J Dermatopathol 2000 Feb; 22(1): 7-16.

Carlson JA, Amin S, Malfetano J, Tien AT, Selkin B, Hou J, Goncharuk V, Wilson VL, Rohwedder A, Ambros R, Ross JS. Concordant p53 and mdm-2 protein expression in vulvar squamous cell carcinoma and adjacent lichen sclerosus. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2001 Jun;9(2):150-63.

Crum CP. Aparelho genital feminino. In: Robbins. Patologia Estrutural e Funcional.5a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996 p.936.

Dahlman-Ghozlan K, Hedblad MA, von Krogh G. Penile lichen sclerosus et atrophicus treated with clobetasol dipropionate 0,05% cream: a retrospective clinical and histopathological study. J Am Acad Dermatol 1999 Mar; 40 (3):451-7.

Derrick EK, Ridley CM, Kobza-Black A, McKee PH, Neill SM. A clinical Study of 23 cases of female anogenital carcinoma. Br J Dermatol 2000 Dec;143(6):1217-23.

Di Paola GR, Leverone NG, Belardi MG. Recurrent vulvar malignancies in a 11-year prospectively followed vulvar dystrophy: a gynecologist's permanent concern.. Gynecol Oncol 1983Feb;15(1):120-1.

Diakomanolis ES, Haidopoulos D, Syndos M, Rodolakis A, Stefanidis K, Chatzipapas J, Michalas S. Vulvar lichen sclerosus in postmenopausal women: a comparative study for treating advanced disease with clobetasol propionate 0,05%. Eur J Gynaecol Oncol. 2002; 23(6): 519-22.

Dwyer CM, Kerr RE, Millan DW. Squamous carcinoma following lichen planus of the vulva. Clinical Experimental Dermatology 1995, March;20 (2): 171-2.

Franck JM , Young AW Jr . Squamous cell carcinoma in situ arising within lichen planus of the vulva. Dermatology Surgery 1995, October; 21 (10): 890-4

Gomez Rueda N, Garcia A, Vighi S, Belardi MG, Cardinal L, Di Paola G . Epithelial alterations adjacent to invasive squamous carcinoma of the vulva. J Reprod med 1994 Jul; 39 (7):526-30.

Hart WR, Norris HJ, Helwig EB . Relation of lichen sclerosus et atrophicus of the vulva to development of carcinoma. *Obstet Gynecol* 1975, **45**: 369–377.

Kashimura M, Matsuura Y, Kawangoe T, Toki N, Sugihara K. Cytology of vulvar squamous neoplasia. Acta Cytol 1993 Nov –Dec;37 (6): 871-5

Lerma E , Matias Guiu- X, Lee SJ, Prat J. Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53, and pRb. Int J Gynecol Pathol. 1999 Jul; 18 (3): 191-7.

Lewis FM. Vulval lichen planus. British Journal Dermatology 1998 – April; 138 (4): 569-75.

Locatelli F, Scarselli G, Branconi F, Citernesi A, Tantini C, Vallecchi C, Savino L. Pre-neoplastic lesions of vulvar cancer. Eur j Gynaecol Oncol 1983; 4 (2): 102-6.

MacLean AB, reid WM, Rolfe KJ, Gammell SJ, Pugh HE, Gatter KC, Wong Te Fong AC, Crow JC, Perrett CW. Role of angiogenesis in benign, premalignant and malignant vulvar lesions. J Reprod Med 2000 Aug; 45 (8): 609-12.

Michelline Moyal-Barraco. Treatment of vulval lichen sclerosus; What the experts do. ISSVD Congress, Portugal, Oct 2001

Nasca MR, Innocenzi D, Micali G. Penile cancer among patients with genital lichen sclerosus. J Am Acad Dermatol 1999 Dec; 41(6):911-4.

Olejak, Mazurek U, Kusmierz D, Rzempoluch J, Wilczok T. The quantitative analysis of E6 HPV and p53 genes expression by QPCR (Taqman) in the assessment of surgical treatment range in vulvar carcinoma induced by HPV infection. Ginecol Pol 2001 Sep; 72(9):723-7.

Oskay T, Sezer HK, Genç C, Kutluay L. Pimecrolimus 1% cream in the treatment of vulvar lichen sclerosus in postmenopausal women. Int J Dermatol. 2007 May; 46 (5): 527-32.

Paricio Rubio JF, Revenga AF, Alfaro TJ, Ramirez GT. Squamous cell carcinoma of the penis arising on lichen sclerosus et atrophicus. J Eur Acad Dermatol Venereol 1999 Mar; 12(2): 153-6.

Pelisse M, Auzerie and Hamel-Teillac. Lichen sclerosus in children: a retrospective study of 95 cases. ISSVD Congress, Portugal, Oct 2001

Pinto AP, Lin MC, Sheets EE, Muto MG, Sun D, Crum CP. Allelic imbalance in lichen sclerosus, hyperplasia, and intraepithelial neoplasia of the vulva. Gynecol Oncol 2000 Apr; 77(1):171-6.

Powell J, Robson A, Cranston D, Wojnarowska F, Turner R. High incidence of lichen sclerosus in patients with squamous cell carcinoma of the penis. Br J Dermatol 2001 Jul; 145(1):85-9.

Powell JJ, Wojnarowska F. Lichen sclerosus. Lancet 1999 May 22;353(9166): 1777-83.

Punnonen R, Soidinmaki H, Kauppila O, Pystynen P. Relationship of vulvar lichen sclerosus et atrophicus to carcinoma. Ann Chir Gynaecol Suppl 1985; 197: 23-5.

Raspollini MR, Asirelli G, Moncini D, Taddei GL. A comparative analysis of lichen sclerosus of the vulva and lichen sclerosus that evolves to vulvar squamous cell carcinoma. Am J Obstet Gynecol. 2007 Dec;197(6):592.e1-5. Epub 2007 Aug 21.

Regauer S, Liegl B, Reich O. Early vulvar lichen sclerosus: a histopathological challenge. Histopathology. 2005 Oct; 47 (4): 340-7.

Rodrigues de Lima G, Gebrim LH, Cintra e Oliveira V, Martins NV. Vulva. In: Ginecologia Oncológica. Atheneu, p. 267, 1999.

Rolfe KJ, Crow JC, Reid WMN, Benjamin E, MacLean AB, Perrett CW (2002) The effects of topical steroids on p53 and Ki67 in vulval lichen sclerosus. Br J Dermatol 147: 503–508

Rolfe KJ, Eva LJ, MacLean AB, Crow JC, Perrett CW, Reid WM.Cell cycle proteins as molecular markers of malignant change in vulvar lichen sclerosus.. Int J Gynecol Cancer. 2001 Mar-Apr;11(2):113-8.

Rouzier R, Morice P, Haie-Meder C, Lhomme C, Avril MF, Duvillard P, Castaigne D. Prognostic significance of epithelial disorders adjacent to invasive vulvar carcinomas. Gynecol Oncol 2001 Jun;81(3):414-9.

Salmaso R, Zen T, Zannol M, Perin D, Marchiori S, Marchetti M. Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol. 2002; 21(5): 479-83.

Scurry J, Beshay V, Cohen C, Allen D. Ki 67 expression in lichen sclerosus of vulva in patients with and without associated squamous cell carcinoma. Histopathology. 1998 May; 32(5): 399-404.

Scurry J, Vanin K. Vulvar squamous cell carcinoma and lichen sclerosus. Australas J Dermatol 1997 Jun;38 Suppl 1: s20-5.

Scurry J, Whitehead J, Healey M. Histology of lichen sclerosus varies according to site and proximity to carcinoma. Am J Dermatopathol 2001 Oct; 23 (5):413-8.

Simonart T, Lahaye M, Simonart JM. Vulvar lichen sclerosus: effect of maintenance treatment with a moisturizer on the course of the disease. Menopause 2008 Jan-Feb; 15 (1): 74-7.

Simonart T, Noel JC, De Dobbeleer G, Simonart JM. Carcinoma of the glans penis arising 20 years after lichen sclerosus. Dermatology 1998; 196 (3): 337-8.

Tan SH, Derrick E, McKeePH, Hobs C, Ridley M, Neill S. Altered p53 expression and epidermal cell proliferation in seen in vulval lichen sclerosus. J Cutan Pathol. 1994 Aug; 21(4): 316-23.

Van Hoeven KH, Randleman GA, Artymyshyn RL – Cytologic findings en lichen sclerosus. Acta Cytol 1997 March-April; 41 (2): 474-80.

Van Seters M, Ten Kate FJ, van Beurden M, Verheijen RH, Meijer CJ, Burger MP, Helmerhorst TJ. In the absence of (early) invasive carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia associated with lichen sclerosus is mainly of undifferentiated type: new insights in histology and aetiology. J Clin Pathol. 2007 May; 60 (5). Epub 2006 May 19.

Vilmer C, Cavelier-Balloy B, Nogues C, Trassard M, Le Doussat V, Analysis of alterations adjacent to invasive vulvar carcinoma and their relationship with the associated carcinoma: a study of 67 cases. European Journal of Gynecology Oncology 1998; 19 (1):25-31.

ANEXOS

Pesquisadora responsável:

Maria Cristina Barcellos

Rua Marcelo Gama, 288/501 – Bairro Higienópolis

Porto Alegre- RS

CEP 90540-040

Telefones de contato:

(51)3343-7587

(51)9983-2361

(51)3488-3448

(51)3214-8153

e-mail: macbarcellos@gmail.com

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

A autora do trabalho intitulado "Expressão Imunoistoquímica dos Marcadores Ki 67 e p53 no Líquen Escleroso Vulvar e no Carcinoma Epidermóide da Vulva", protocolado sob o número 615/08 no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Maria Cristina Barcellos, se compromete em tratar de forma confidencial os dados das pacientes incluídas neste estudo.

Porto Alegre, 01 de Junho de 2008.

Maria Cristina Barcellos

DADOS SUBMETIDOS A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Descriptive Statistics

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade	44	27	96	66,91	17,082
Valid N (listwise)	44				

Tamanho

		Freqüência	%	% Válida	% Acumulada
Valid	Até 2 cm	17	36,17	36,17	36,17
	>2 até 5cm	20	42,55	42,55	78,72
	> 5cm	10	21,28	21,28	100,0
	Total	47	100,0	100,0	

Histologia

		Freqüência	%	% Válida	% Acumulada
Valid	Carcinoma Epidermóide bem diferenciado	33	70,21	70,21	70,21
	Carcinoma Epidermóide Moderadamente diferenciado	6	12,77	12,77	82,98
	Carcinoma Epidermóide pouco diferenciado	1	2,13	2,13	85,11
	Sem especificação	7	14,89	14,89	100,00
	Total	47	100,0	100,0	

Lesão

		Freqüência	%	% Válida	% Acumulada
Valid	Plano	3	6,38	6,38	6,38
	Erosado	2	4,26	4,26	10,64
	Vegetante	4	8,51	8,51	19,15
	Ulcerado	27	57,45	57,45	76,60
	Vegetante e Ulcerado	9	19,15	19,15	95,74
	Nodular	2	4,26	4,26	100,0
	Total	47	100,0	100,0	

***Para descrição dos dados sempre utilizar as porcentagens da coluna "Porcentagem Válida"**

Cruzamentos

Tamanho x KI 67 Tumoral

			ki67tumor		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	10	7	17
		% em ki67tumor	34,48%	38,89%	36,17%
		Resíduo Ajustado	-,3	,3	
	>2 até 5cm	Freqüência	13	7	20
		% em ki67tumor	44,83%	38,89%	42,55%
		Resíduo Ajustado	,4	-,4	
	> 5cm	Freqüência	6	4	10
		% em ki67tumor	20,69%	22,22%	21,28%
		Resíduo Ajustado	-,1	,1	
Total		Freqüência	29	18	47
		% em ki67tumor	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,164[a]	2	,921	,928		
Likelihood Ratio	,164	2	,921	,928		
Fisher's Exact Test	,267			,928		
Linear-by-Linear Association	,016[b]	1	,899	1,000	,530	,157
N of Valid Cases	47					

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,83.

b. The standardized statistic is -,127.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e a detecção por ki67 tumoral (p=0,928)

As porcentagens têm seus totais na coluna, ou seja, 34,48% dos pacientes com resultado positivo tinham tumor com até 2 cm, 44,83% entre 2 e 5 cm e 20,69% com tumor com mais de 5 cm.

Tamanho x KI 67 Líquen

Crosstab

			ki67líquen		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	7	10	17
		% em ki67líquen	33,33%	38,46%	36,17%
		Resíduo Ajustado	-,4	,4	
	>2 até 5cm	Freqüência	10	10	20
		% em ki67líquen	47,62%	38,46%	42,55%
		Resíduo Ajustado	,6	-,6	
	> 5cm	Freqüência	4	6	10
		% em ki67líquen	19,05%	23,08%	21,28%
		Resíduo Ajustado	-,3	,3	
Total		Freqüência	21	26	47
		% em ki67líquen	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,402[a]	2	,818	,805		
Likelihood Ratio	,402	2	,818	,805		
Fisher's Exact Test	,461			,805		
Linear-by-Linear Association	,002[b]	1	,960	1,000	,557	,154
N of Valid Cases	47					

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,47.

b. The standardized statistic is -,050.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e ki67 líquen (p=0,805)

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Tamanho x P53 Tumoral

			p53 tumor		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	8	9	17
		% em p53 tumor	36,36%	36,00%	36,17%
		Resíduo Ajustado	,0	,0	
	>2 até 5cm	Freqüência	10	10	20
		% em p53 tumor	45,45%	40,00%	42,55%
		Resíduo Ajustado	,4	-,4	
	> 5cm	Freqüência	4	6	10
		% em p53 tumor	18,18%	24,00%	21,28%
		Resíduo Ajustado	-,5	,5	
Total		Freqüência	22	25	47
		% em p53 tumor	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	,268[a]	2	,874	,931		
Likelihood Ratio	,270	2	,874	,931		
Fisher's Exact Test	,334			,931		
Linear-by-Linear Association	,079[b]	1	,778	,847	,466	,148
N of Valid Cases	47					

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,68.

b. The standardized statistic is ,282.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e p53 tumoral (p=0,931)

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Tamanho x P53 Líquen

			p53 líquen		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	2	15	17
		% em p53 líquen	22,22%	39,47%	36,17%
		Resíduo Ajustado	-1,0	1,0	
	>2 até 5cm	Freqüência	5	15	20
		% em p53 líquen	55,56%	39,47%	42,55%
		Resíduo Ajustado	,9	-,9	
	> 5cm	Freqüência	2	8	10
		% em p53 líquen	22,22%	21,05%	21,28%
		Resíduo Ajustado	,1	-,1	
Total		Freqüência	9	38	47
		% em p53 líquen	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,046[a]	2	,593	,571		
Likelihood Ratio	1,091	2	,580	,571		
Fisher's Exact Test	1,103			,640		
Linear-by-Linear Association	,438[b]	1	,508	,625	,337	,155
N of Valid Cases	47					

a. 3 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,91.

b. The standardized statistic is -,661.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e p53 líquen (p=0,640)

As porcentagens têm seus totais na coluna.

P53 Tumoral x P53 Líquen

			p53 líquen		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
p53 tumor	Positivo (> 10%)	Freqüência	7	15	22
		% em p53 líquen	77,78%	39,47%	46,81%
		Resíduo Ajustado	2,1	-2,1	
	Negativo	Freqüência	2	23	25
		% em p53 líquen	22,22%	60,53%	53,19%
		Resíduo Ajustado	-2,1	2,1	
Total		Freqüência	9	38	47
		% em p53 líquen	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	4,288[b]	1	,038	,063	,044	
Continuity Correction[a]	2,888	1	,089			
Likelihood Ratio	4,447	1	,035	,063	,044	
Fisher's Exact Test				,063	,044	
Linear-by-Linear Association	4,197[c]	1	,041	,063	,044	,038
N of Valid Cases	47					

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,21.

c. The standardized statistic is 2,049.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o resultado do teste p53 tumoral e o resultado do teste p53 líquen (p=0,063)

As porcentagens têm seus totais na coluna.

KI67 Tumoral x KI67 Líquen

			ki67tumor		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
ki67líquen	Positivo (> 10%)	Freqüência	19	2	21
		% em ki67tumor	65,52%	11,11%	44,68%
		Resíduo Ajustado	3,6	-3,6	
	Negativo	Freqüência	10	16	26
		% em ki67tumor	34,48%	88,89%	55,32%
		Resíduo Ajustado	-3,6	3,6	
Total		Freqüência	29	18	47
		% em ki67tumor	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	13,301[b]	1	,000	,000	,000	
Continuity Correction[a]	11,191	1	,001			
Likelihood Ratio	14,702	1	,000	,000	,000	
Fisher's Exact Test				,000	,000	
Linear-by-Linear Association	13,018[c]	1	,000	,000	,000	,000
N of Valid Cases	47					

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,04.

c. The standardized statistic is 3,608.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, existem evidências de que existe associação entre o resultado do teste KI67 tumoral e o resultado do teste KI67 líquen (p<0,001).

Pela análise de resíduos temos que, a categoria "Positivo" do teste KI tumoral está associada com a categoria "Positivo" do teste KI líquen e as categorias "Negativo" dos dois testes também estão associadas.

As porcentagens têm seus totais na coluna.

P53 tumoral x KI67 Tumoral

			ki67tumor		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
p53 tumor	Positivo (> 10%)	Freqüência	16	6	22
		% em ki67tumor	55,17%	33,33%	46,81%
		Resíduo Ajustado	1,5	-1,5	
	Negativo	Freqüência	13	12	25
		% em ki67tumor	44,83%	66,67%	53,19%
		Resíduo Ajustado	-1,5	1,5	
Total		Freqüência	29	18	47
		% em ki67tumor	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	2,128[b]	1	,145	,229	,123	
Continuity Correction[a]	1,341	1	,247			
Likelihood Ratio	2,158	1	,142	,229	,123	
Fisher's Exact Test				,229	,123	
Linear-by-Linear Association	2,082[c]	1	,149	,229	,123	,085
N of Valid Cases	47					

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,43.

c. The standardized statistic is 1,443.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não existem evidências de que existe associação entre o resultado do teste P53 tumoral e o resultado do teste KI67 tumoral (p=0,229).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

P53 Líquen x KI67 Líquen

			p53 líquen		
			Positivo (> 10%)	Negativo	Total
ki67líquen	Positivo (> 10%)	Freqüência	8	13	21
		% em p53 líquen	88,89%	34,21%	44,68%
		Resíduo Ajustado	3,0	-3,0	
	Negativo	Freqüência	1	25	26
		% em p53 líquen	11,11%	65,79%	55,32%
		Resíduo Ajustado	-3,0	3,0	
Total		Freqüência	9	38	47
		% em p53 líquen	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	8,802[b]	1	,003	,006	,004	
Continuity Correction[a]	6,728	1	,009			
Likelihood Ratio	9,520	1	,002	,006	,004	
Fisher's Exact Test				,006	,004	
Linear-by-Linear Association	8,614[c]	1	,003	,006	,004	,004
N of Valid Cases	47					

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,02.

c. The standardized statistic is 2,935.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, há evidências da existência da associação entre o resultado do teste P53 líquen e o resultado do teste KI67 líquen (p=0,006).

Pela análise dos resíduos ajustados a categoria “KI 67 Positivo” parece estar associada a categoria “P53 Positivo”, e o mesmo para as categorias “KI 67 Negativo” e “P53 Negativo”.

Tamanho x Positividade P53 Líquen

Crosstab

			p53líquenPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	15	2	0	17
		% em p53líquenPOS	39,47%	25,00%	,00%	36,17%
		Resíduo Ajustado	1,0	-,7	-,8	
	>2 até 5cm	Freqüência	15	4	1	20
		% em p53líquenPOS	39,47%	50,00%	100,00%	42,55%
		Resíduo Ajustado	-,9	,5	1,2	
	> 5cm	Freqüência	8	2	0	10
		% em p53líquenPOS	21,05%	25,00%	,00%	21,28%
		Resíduo Ajustado	-,1	,3	-,5	
Total		Freqüência	38	8	1	47
		% em p53líquenPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,983[a]	4	,739	,869		
Likelihood Ratio	2,366	4	,669	,869		
Fisher's Exact Test	2,257			,869		
Linear-by-Linear Association	,398[b]	1	,528	,679	,337	,134
N of Valid Cases	47					

a. 6 cells (66,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,21.

b. The standardized statistic is ,631.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e a positividade do teste P53 Líquen (p=0,869).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Tamanho x Positividade P53 Tumoral

			p53tumorPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	9	3	5	17
		% em p53tumorPOS	36,00%	33,33%	38,46%	36,17%
		Resíduo Ajustado	,0	-,2	,2	
	>2 até 5cm	Freqüência	10	5	5	20
		% em p53tumorPOS	40,00%	55,56%	38,46%	42,55%
		Resíduo Ajustado	-,4	,9	-,4	
	> 5cm	Freqüência	6	1	3	10
		% em p53tumorPOS	24,00%	11,11%	23,08%	21,28%
		Resíduo Ajustado	,5	-,8	,2	
Total		Freqüência	25	9	13	47
		% em p53tumorPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	1,030[a]	4	,905	,927		
Likelihood Ratio	1,090	4	,896	,920		
Fisher's Exact Test	1,088			,927		
Linear-by-Linear Association	,031[b]	1	,859	,911	,476	,088
N of Valid Cases	47					

a. 5 cells (55,6%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,91.

b. The standardized statistic is -,177.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e a positividade do teste P53 Tumoral (p=0,927).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Tamanho x Positividade KI 67 Líquen

			ki67líquenPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	12	4	1	17
		% em ki67líquenPOS	41,38%	25,00%	50,00%	36,17%
		Resíduo Ajustado	,9	-1,1	,4	
	>2 até 5cm	Freqüência	10	9	1	20
		% em ki67líquenPOS	34,48%	56,25%	50,00%	42,55%
		Resíduo Ajustado	-1,4	1,4	,2	
	> 5cm	Freqüência	7	3	0	10
		% em ki67líquenPOS	24,14%	18,75%	,00%	21,28%
		Resíduo Ajustado	,6	-,3	-,8	
Total		Freqüência	29	16	2	47
		% em ki67líquenPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	2,636[a]	4	,621	,669		
Likelihood Ratio	3,069	4	,546	,698		
Fisher's Exact Test	2,769			,648		
Linear-by-Linear Association	,000[b]	1	,994	1,000	,566	,133
N of Valid Cases	47					

a. 4 cells (44,4%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,43.

b. The standardized statistic is -,007.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e a positividade do teste KI67 Líquen (p=0,648).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Tamanho x Positividade KI 67 Tumoral

			ki67tumorPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
tamanho	Até 2 cm	Freqüência	8	9	0	17
		% em ki67tumorPOS	40,00%	37,50%	,00%	36,17%
		Resíduo Ajustado	,5	,2	-1,3	
	>2 até 5cm	Freqüência	7	11	2	20
		% em ki67tumorPOS	35,00%	45,83%	66,67%	42,55%
		Resíduo Ajustado	-,9	,5	,9	
	> 5cm	Freqüência	5	4	1	10
		% em ki67tumorPOS	25,00%	16,67%	33,33%	21,28%
		Resíduo Ajustado	,5	-,8	,5	
Total		Freqüência	20	24	3	47
		% em ki67tumorPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	2,492[a]	4	,646	,671		
Likelihood Ratio	3,511	4	,476	,594		
Fisher's Exact Test	2,718			,645		
Linear-by-Linear Association	,227[b]	1	,634	,748	,377	,114
N of Valid Cases	47					

a. 4 cells (44,4%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,64.

b. The standardized statistic is ,476.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não há evidências de que exista associação entre o tamanho do tumor e a positividade do teste KI67 Tumoral (p=0,645).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Histologia x P53 Líquen Positividade

			p53líquenPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
histologia	Carcinoma Epidermóide bem diferenciado	Freqüência	26	6	1	33
		% em p53líquenPOS	68,42%	75,00%	100,00%	70,21%
		Resíduo Ajustado	-,6	,3	,7	
	Carcinoma Epidermóide Moderadamente diferenciado	Freqüência	4	2	0	6
		% em p53líquenPOS	10,53%	25,00%	,00%	12,77%
		Resíduo Ajustado	-,9	1,1	-,4	
	Carcinoma Epidermóide pouco diferenciado	Freqüência	1	0	0	1
		% em p53líquenPOS	2,63%	,00%	,00%	2,13%
		Resíduo Ajustado	,5	-,5	-,1	
	Sem especificação	Freqüência	7	0	0	7
		% em p53líquenPOS	18,42%	,00%	,00%	14,89%
		Resíduo Ajustado	1,4	-1,3	-,4	
Total		Freqüência	38	8	1	47
		% em p53líquenPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	3,280[a]	6	,773	,573		
Likelihood Ratio	4,701	6	,583	,507		
Fisher's Exact Test	6,322			,603		
Linear-by-Linear Association	1,470[b]	1	,225	,247	,135	,052
N of Valid Cases	47					

a. 9 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,02.

b. The standardized statistic is -1,213.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não existem evidências de que existe associação entre a positividade do teste P53 Líquen e a histologia (p=0,603).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Histologia x Positividade P53 Tumoral

			p53tumorPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
histologia	Carcinoma Epidermóide bem diferenciado	Freqüência	18	8	7	33
		% em p53tumorPOS	72,00%	88,89%	53,85%	70,21%
		Resíduo Ajustado	,3	1,4	-1,5	
	Carcinoma Epidermóide Moderadamente diferenciado	Freqüência	2	0	4	6
		% em p53tumorPOS	8,00%	,00%	30,77%	12,77%
		Resíduo Ajustado	-1,0	-1,3	2,3	
	Carcinoma Epidermóide pouco diferenciado	Freqüência	1	0	0	1
		% em p53tumorPOS	4,00%	,00%	,00%	2,13%
		Resíduo Ajustado	,9	-,5	-,6	
	Sem especificação	Freqüência	4	1	2	7
		% em p53tumorPOS	16,00%	11,11%	15,38%	14,89%
		Resíduo Ajustado	,2	-,4	,1	
Total		Freqüência	25	9	13	47
		% em p53tumorPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	6,838[a]	6	,336	,347		
Likelihood Ratio	7,511	6	,276	,358		
Fisher's Exact Test	6,021			,405		
Linear-by-Linear Association	,047[b]	1	,828	,880	,438	,058
N of Valid Cases	47					

a. 9 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,19.

b. The standardized statistic is ,217.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não existem evidências de que existe associação entre a positividade do teste P53 Tumoral e a histologia (p=0,405).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Histologia X Positividade KI67 Líquen

			ki67líquenPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
histologia	Carcinoma Epidermóide bem diferenciado	Freqüência	20	11	2	33
		% em ki67líquenPOS	68,97%	68,75%	100,00%	70,21%
		Resíduo Ajustado	-,2	-,2	,9	
	Carcinoma Epidermóide Moderadamente diferenciado	Freqüência	3	3	0	6
		% em ki67líquenPOS	10,34%	18,75%	,00%	12,77%
		Resíduo Ajustado	-,6	,9	-,6	
	Carcinoma Epidermóide pouco diferenciado	Freqüência	1	0	0	1
		% em ki67líquenPOS	3,45%	,00%	,00%	2,13%
		Resíduo Ajustado	,8	-,7	-,2	
	Sem especificação	Freqüência	5	2	0	7
		% em ki67líquenPOS	17,24%	12,50%	,00%	14,89%
		Resíduo Ajustado	,6	-,3	-,6	
Total		Freqüência	29	16	2	47
		% em ki67líquenPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	2,189[a]	6	,902	,933		
Likelihood Ratio	3,008	6	,808	,916		
Fisher's Exact Test	3,591			,933		
Linear-by-Linear Association	,601[b]	1	,438	,496	,266	,073
N of Valid Cases	47					

a. 10 cells (83,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,04.

b. The standardized statistic is -,775.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não existem evidências de que existe associação entre a positividade do teste KI67 Líquen e a histologia (p=0,933).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Histologia X KI67 Tumoral

			ki67tumorPOS			Total
			Negativo (< 10%)	10% a 50% positivo	Acima de 50% positivo	
histologia	Carcinoma Epidermóide bem diferenciado	Count	12	19	2	33
		% within ki67tumorPOS	60,00%	79,17%	66,67%	70,21%
		Adjusted Residual	-1,3	1,4	-,1	
	Carcinoma Epidermóide Moderadamente diferenciado	Count	2	3	1	6
		% within ki67tumorPOS	10,00%	12,50%	33,33%	12,77%
		Adjusted Residual	-,5	-,1	1,1	
	Carcinoma Epidermóide pouco diferenciado	Count	1	0	0	1
		% within ki67tumorPOS	5,00%	,00%	,00%	2,13%
		Adjusted Residual	1,2	-1,0	-,3	
	Sem especificação	Count	5	2	0	7
		% within ki67tumorPOS	25,00%	8,33%	,00%	14,89%
		Adjusted Residual	1,7	-1,3	-,7	
Total		Count	20	24	3	47
		% within ki67tumorPOS	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	5,554[a]	6	,475	,369		
Likelihood Ratio	5,963	6	,427	,430		
Fisher's Exact Test	6,474			,369		
Linear-by-Linear Association	2,794[b]	1	,095	,097	,057	,023
N of Valid Cases	47					

a. 10 cells (83,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,06.

b. The standardized statistic is -1,672.

Interpretação: Através do teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, não xistem evidências de que existe associação entre a positividade do teste KI67 Tumoral e a histologia (p=0,369).

As porcentagens têm seus totais na coluna.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo