

Expressão de p16, p53, GATA3 e CK17 nas neoplasias intraepiteliais vulvares

Expression of p16, p53, GATA3 and CK17 in vulvar intraepithelial neoplasia

Richard Wirth¹ , Edison Capp^{1,2,3*} , Lúcia Maria Kliemann^{1,4,5} 

RESUMO

Objetivo: Este estudo compara os padrões de expressão imunohistoquímica de p16, p53, CK17 e GATA3 na lesão intraepitelial escamosa vulvar de alto grau (HSIL), na neoplasia intraepitelial vulvardiferenciada (dVIN) e no líquen escleroso (LS), a fim de identificar potenciais marcadores para o diagnóstico diferencial. **Método:** um total de 115 espécimes de biópsias vulvares (HSIL=81; dVIN=11; LS=23) foi revisado por um patologista ginecológico, e áreas representativas foram incluídas em microarranjos teciduais. A imunomarcagem para p16, p53, CK17 e GATA3 foi avaliada de acordo com critérios padronizados baseados em padrões de expressão. Fragmentos sem epitélio de espessura completa ou sem controle interno foram excluídos das análises específicas de cada marcador. **Resultados:** a expressão do tipo block de p16 ocorreu em 91,1% dos casos de HSIL, mas não foi observada em nenhum caso de dVIN e esteve presente em apenas 10% dos casos de LS. Padrões aberrantes de p53 foram identificados em 30% dos casos de dVIN e em 2,7% dos casos de HSIL. A HSIL apresentou mais frequentemente expressão superficial ou focal de CK17, enquanto o LS demonstrou expressão difusa. A dVIN apresentou redução da expressão de GATA3 (padrão 2) em 81,8% dos casos, em comparação com 15% dos casos de HSIL. **Conclusões:** um painel combinado incluindo p16, p53, CK17 e GATA3 auxilia na distinção entre HSIL e dVIN, particularmente em casos com morfologia ambígua. Entretanto, a sobreposição dos padrões observados entre dVIN e LS limita sua utilidade para essa comparação. Estudos de validação utilizando cortes histológicos completos são necessários.

Palavras-chave: vulva; lesões intraepiteliais escamosas; neoplasia intraepitelial vulvar; líquen escleroso vulvar; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Objective: This study compares the immunohistochemical expression patterns of p16, p53, CK17, and GATA3 in vulvar high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (dVIN), and lichen sclerosus (LS) to identify potential markers for differential diagnosis. **Methods:** A total of 115 vulvar biopsy specimens (HSIL=81; dVIN=11; LS=23) were reviewed by a gynecologic pathologist, and representative cores were included in tissue microarrays. Immunohistochemical staining for p16, p53, CK17, and GATA3 was assessed according to standardized pattern-based criteria.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia – Porto Alegre (RS), Brasil.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina – Porto Alegre (RS), Brasil.

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Ginecologia e Obstetrícia – Porto Alegre (RS), Brasil

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina – Porto Alegre (RS), Brasil.

⁵Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Patologia – Porto Alegre (RS), Brasil.

*Autor correspondente: 00010315@ufrgs.br

Conflitos de interesse: nada a declarar. Fonte de financiamento: Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROAP/CAPES) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Recebido em: 01/03/2026. Aprovado em: 01/04/2026

Cores lacking full-thickness epidermis or internal control were excluded from marker-specific analyses. **Results:** Block-type p16 expression occurred in 91.1% of HSILs, but in none of the dVINs and in 10% of LS cases. Aberrant p53 patterns were present in 30% of dVINs and 2.7% of HSILs. HSIL most frequently exhibited superficial or focal CK17 staining, whereas LS showed diffuse expression. The dVIN demonstrated GATA3 reduction (pattern 2) in 81.8% of cases compared with 15% of HSILs. **Conclusions:** A combined panel including p16, p53, CK17, and GATA3 aids in distinguishing HSIL from dVIN, particularly when morphology is ambiguous. However, the overlap of observed patterns between dVIN and LS limits their utility for this comparison. Validation in whole-section studies is warranted.

Keywords: vulva; squamous intraepithelial lesions; vulvar intraepithelial neoplasia; vulvar lichen sclerosus; immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna mais comum da vulva e pode surgir por pelo menos duas vias carcinogênicas distintas: uma associada e outra independente da infecção pelo papilomavírus humano (HPV)¹. A via carcinogênica associada ao HPV ocorre, em geral, em mulheres em idade reprodutiva² e se manifesta como lesões intraepiteliais escamosas vulvares de alto grau (HSIL), cuja relação com o HPV pode ser facilmente demonstrada pela forte e difusa expressão imunohistoquímica da proteína p16^{3,4}. Por outro lado, a via independente do HPV é mais frequente durante a menopausa⁵ e leva ao desenvolvimento da neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada (dVIN), que apresenta rápida progressão para carcinoma invasivo⁶.

Além disso, a via independente do HPV está frequentemente relacionada a mutações no gene proteína tumoral p53 (TP53)⁷, que podem ser identificadas por meio da presença de padrões aberrantes de expressão da proteína p53 na imunohistoquímica^{7,8}. Sabe-se também que o líquen escleroso (LS), uma doença inflamatória autoimune que acomete a pele da vulva, pode estar associado a mutações do gene TP53 no epitélio afetado⁹. Dessa forma, o LS frequentemente precede ou coexiste com a neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada¹⁰.

Adicionalmente, o aspecto histopatológico e o perfil de expressão imunohistoquímica do LS e da dVIN são bastante semelhantes, uma vez que ambas as condições apresentam alterações citológicas na camada basal do epitélio e podem exibir expressão mutada de p53. Na tentativa de identificar novos marcadores imunohistoquímicos que auxiliem na diferenciação dessas doenças, estudos têm sido realizados com os marcadores Proteína de Ligação GATA 3 (GATA3) e Citoqueratina 17 (CK17), os quais demonstraram potencial para discriminar LS, dVIN e HSIL¹¹⁻¹³.

Dois estudos^{12,13} sugerem que o GATA3 pode auxiliar na distinção entre LS, caracterizado por marcação

forte e difusa em todas as camadas do epitélio, e dVIN, que apresenta redução da expressão principalmente na camada basal. Outro estudo¹¹ demonstrou que a expressão de CK17 é reduzida e restrita ao epitélio superficial na HSIL quando comparada ao LS e à dVIN. Além disso, há evidências de que a grande maioria dos casos de dVIN apresenta expressão forte e difusa de CK17, enquanto a HSIL exibe o padrão oposto¹⁴.

Embora a p16 seja o marcador mais intuitivo para as HSIL associadas ao HPV, ela foi incluída neste estudo com três objetivos principais:

- (i) garantir uma classificação rigorosa dos casos;
- (ii) servir como referência interna para a comparação dos padrões de expressão de p53, CK17 e GATA3 entre os diferentes grupos diagnósticos; e
- (iii) avaliar se um painel imunohistoquímico combinado poderia aprimorar a distinção entre lesões com morfologia ambígua.

Estudos anteriores avaliaram individualmente os marcadores CK17 e GATA3 em lesões precursoras vulvares e destacaram seu potencial valor diagnóstico. No entanto, ainda são escassos os dados que comparem diretamente os quatro marcadores (p16, p53, CK17 e GATA3) em uma mesma série de casos e que analisem seu desempenho discriminatório de forma combinada. Assim, o presente estudo avaliou conjuntamente esses marcadores em casos de HSIL, dVIN e LS.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal no qual foram revisados todos os laudos de biópsias e espécimes cirúrgicos de vulva provenientes do laboratório de patologia de um hospital terciário localizado no sul do Brasil. Foi calculado um tamanho amostral de 108 pacientes para testar a existência de associação entre os marcadores

imunohistoquímicos e as lesões estudadas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa antes de seu início (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE: 64787722.0.0000.5327).

A estimativa amostral considerou poder estatístico de 80%, nível de significância de 5%, tamanho de efeito de Cohen (w) igual a 0,3 (efeito moderado) e dois graus de liberdade, conforme definido pelos pesquisadores. O cálculo foi realizado utilizando a versão *online* da ferramenta Power and Sample Size for Health Researchers (PSS Health)¹⁵.

Os casos foram selecionados de forma sequencial e contínua, incluindo os materiais recebidos pelo laboratório entre 1º de novembro de 2014 e 30 de junho de 2019, até que fosse alcançado o número de casos previsto no cálculo amostral, considerando-se possíveis perdas. Após a revisão dos laudos anatomopatológicos, os casos com diagnóstico compatível com HSIL, dVIN, LS ou terminologias semelhantes foram reavaliados microscopicamente por um patologista sem conhecimento do diagnóstico original. Para isso, novos cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE) foram confeccionados a partir dos blocos de parafina selecionados.

Todas as lâminas coradas por HE foram revisadas por um patologista ginecológico antes da construção dos microarranjos teciduais (TMA; *tissue microarrays*). O diagnóstico de HSIL (associada ao HPV) exigiu morfologia compatível (citologia verrucosa ou basaloide com atipia envolvendo toda a espessura epitelial) e expressão do tipo *block* para p16 (marcação nuclear e citoplasmática contínua e intensa), conforme recomendações atuais. O diagnóstico de dVIN (independente do HPV) exigiu atipia da camada basal associada à queratinização precoce/disqueratose e alterações da maturação epitelial; a marcação *block* para p16 deveria estar ausente, e padrões aberrantes de p53 (superexpressão, padrão nulo ou citoplasmático) eram registrados quando presentes, seguindo critérios validados baseados em padrões de expressão. O diagnóstico de LS requereu esclerose estromal clássica, adelgaçamento epidérmico com alterações da camada basal e inflamação liquenoide. Quando a dVIN estava adjacente ao LS, o caso era classificado como dVIN.

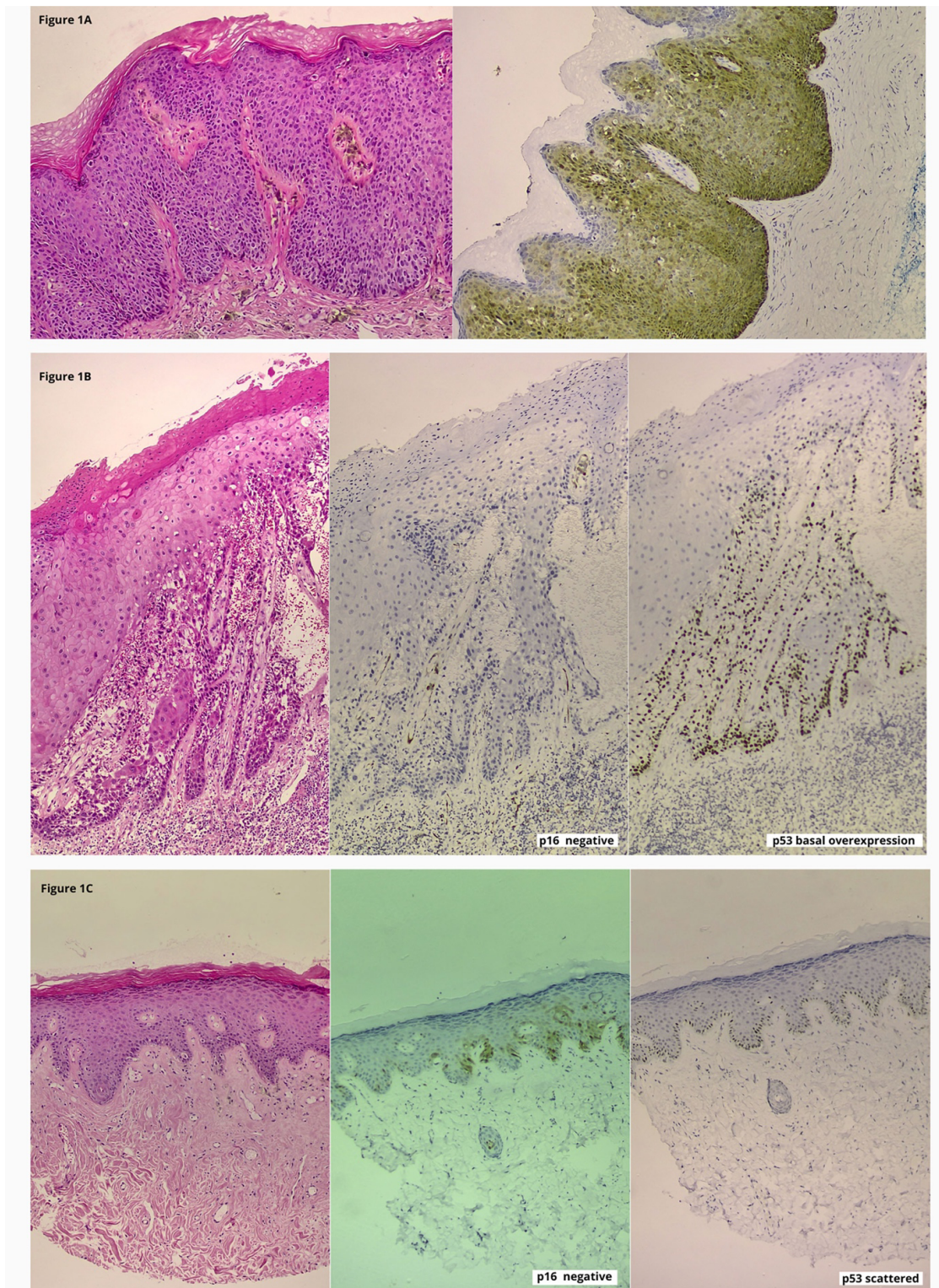
Casos discordantes (por exemplo, expressão *block* de p16 em biópsias inicialmente classificadas como LS ou presença simultânea de p16 *block* e padrão mutante de p53) foram reavaliados. Quando a morfologia favorecia HSIL, o caso era reclassificado; quando a incerteza persistia, o caso era excluído do TMA para evitar erros de classificação.

Para cada caso, o corte corado por HE utilizado para a revisão morfológica correspondia diretamente ao fragmento analisado na imunohistoquímica, sendo obtido do mesmo bloco de parafina e separado por apenas 4 μ m da lâmina utilizada para imunomarcação. A classificação diagnóstica foi estabelecida na amostra original completa, mas as interpretações do HE e da imunohistoquímica foram realizadas na mesma área tecidual representada no fragmento do TMA.

Após a revisão diagnóstica, os blocos classificados em um dos três diagnósticos foram marcados em áreas representativas para a construção dos TMA. Foram confeccionados três blocos de TMA, cada um com capacidade para 60 amostras de 2,0 mm de diâmetro. De cada bloco foram obtidas cinco lâminas: uma corada por HE e quatro submetidas à imunohistoquímica com anticorpos contra p16 (clone MX007, Easy Path), p53 (clone DO-7, Easy Path), GATA3 (clone L50-823, Easy Path) e CK17 (clone Ks17.E3, Cell Marque).

Os anticorpos foram incubados por 32 minutos a 37°C, seguidos pelo bloqueio da peroxidase com o reagente Ultra-view Peroxidase Inhibitor (3% H₂O₂). Após a incubação dos anticorpos primários e a inibição da peroxidase, a reação foi revelada pelo sistema de detecção Ultraview utilizando diaminobenzidina como cromógeno. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, diferenciadas com reagente de *bluing* (Li₂CO₃ + Na₂CO₃), desidratadas, montadas e posteriormente analisadas. Todas as lâminas foram examinadas pelo mesmo patologista responsável pelos diagnósticos histológicos. A expressão de p16 foi considerada positiva quando apresentava expressão do tipo *block*, definida como marcação nuclear e citoplasmática intensa e contínua das células basais. Nos demais casos, a marcação foi considerada negativa¹⁶. Para a p53, os padrões de expressão imunohistoquímica foram classificados conforme descrito por Tessier-Cloutier et al.¹⁷ (Figura 1):

- Disperso (*scattered*): marcação nuclear heterogênea de intensidade variável nas camadas basal e parabasal;
- Preservação basal (*basal sparing*): marcação heterogênea nas células superficiais e parabasais, sem marcação das células basais;
- Superexpressão basal: marcação nuclear forte e uniforme em pelo menos 80% das células basais, sem extensão parabasal;
- Superexpressão parabasal ou difusa: marcação nuclear forte e uniforme em pelo menos 80% das células basais associada à marcação intensa e difusa das células parabasais;



Padrões representativos de imunomarcção observados em lesão intraepitelial escamosa vulvar de alto grau (HSIL), neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada (dVIN) e líquen escleroso (LS). (A) HSIL apresentando positividade para p16 do tipo *block*, com marcação nuclear e citoplasmática intensa. (B) dVIN demonstrando ausência de marcação *block* para p16 e padrão aberrante de superexpressão basal de p53. (C) LS com p16 negativo e expressão de p53 do tipo *wild-type*. Critérios de avaliação: a marcação *block* para p16 foi definida como positividade nuclear e citoplasmática forte e contínua envolvendo $\geq 70\%$ da espessura epitelial. Os padrões de p53 foram classificados como *wild-type*, superexpressão, nulo ou citoplasmático, de acordo com diretrizes estabelecidas. Fragmentos sem controle interno (estroma ou epitélio não neoplásico adjacente) foram excluídos das análises de p53.

Figura 1. Expressão de p16 e p53 em HSIL, dVIN e LS vulvares.

- Padrão nulo (*null*): ausência completa de marcação na presença de controle interno positivo; e
- Citoplasmático: marcação citoplasmática inequívoca, com ou sem marcação nuclear concomitante.

Como lesões raras podem apresentar positividade do tipo *block* para p16 associada a um padrão aberrante de p53, todos esses casos foram submetidos à revisão morfológica detalhada. Seguindo os algoritmos diagnósticos atuais, quando ambos os marcadores estavam presentes, a morfologia foi priorizada. O diagnóstico de dVIN foi considerado quando havia atipia basal associada à maturação anormal; o de HSIL foi mantido apenas na presença da morfologia clássica da lesão. Casos persistentemente indeterminados foram excluídos da análise.

Os padrões disperso e de preservação basal foram classificados como padrão *wild-type* (tipo selvagem), enquanto os demais foram classificados como padrão mutante ou aberrante¹⁷.

Para o marcador GATA3, foram coletadas as seguintes informações¹²:

- Intensidade da expressão nuclear (fraca, intermediária ou forte);
- Percentual de células marcadas (≤ 25 , 26–50, 51–75 ou $>75\%$);
- Localização das células positivas (restrita à camada basal ou presente nas camadas basal e/ou parabasal).

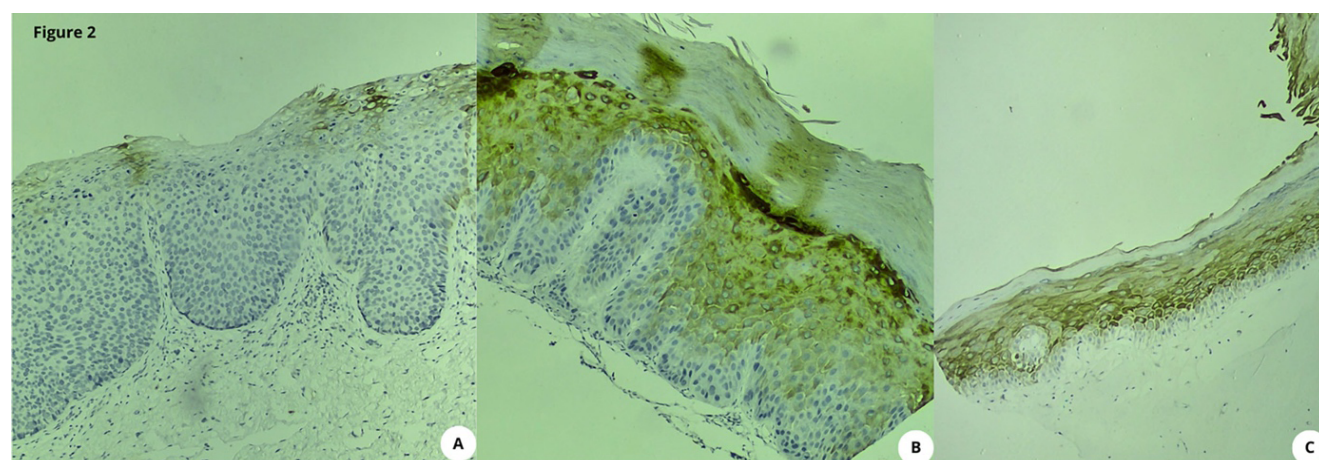
Essas informações foram agrupadas em três padrões (Figura 2):

- Padrão 0: expressão nuclear forte e difusa em todas as camadas da epiderme (semelhante ao epitélio normal adjacente).
- Padrão 1: perda de expressão em 25–75% das células da camada basal.
- Padrão 2: perda de expressão em mais de 75% das células da camada basal, associada à redução da expressão na camada parabasal.

Para o marcador CK17, foram coletadas as seguintes informações (Figura 3)¹⁴:

- Intensidade da expressão citoplasmática (0=ausente; 1=fraca; 2=intermediária; 3=forte);
- Localização da expressão (1=apenas células superficiais; 2=células suprabasais; 3=toda a espessura do epitélio);
- Distribuição da expressão (1=focal; 2=difusa).

Os fragmentos de 2,0 mm foram retirados de áreas lesionais orientadas para incluir toda a espessura da epiderme sempre que possível. Para p53, os padrões estabelecidos (*wild-type* vs. aberrante) foram analisados apenas quando havia controle interno adequado (estroma ou epitélio não neoplásico adjacente). Fragmentos sem controle interno ou com cortes tangenciais foram excluídos das análises específicas desse marcador. Para CK17 e GATA3 foram utilizados sistemas semiquantitativos previamente



Imunomarcagem representativa de CK17 ilustrando os padrões de distribuição observados nas diferentes categorias diagnósticas. (A) HSIL com expressão focal ou superficial de CK17. (B) dVIN com expressão reduzida ou descontínua de CK17 restrita às camadas basais. (C) LS apresentando positividade difusa para CK17 em toda a espessura do epitélio. Critérios de avaliação: a coloração foi analisada de forma semiquantitativa de acordo com a distribuição nas camadas epiteliais (superficial, suprabasal ou em toda a espessura) e a intensidade da marcação (fraca, moderada ou forte). Fragmentos sem epiderme de espessura completa ou afetados por cortes tangenciais foram excluídos da análise de CK17.

Figura 2. Expressão de CK17 em HSIL, dVIN e LS.

definidos, focados na localização da expressão e na manutenção/perda da marcação basal e parabasal. Fragmentos sem epitélio de espessura completa também foram excluídos dessas análises.

Além dos dados anatomopatológicos e imunohistoquímicos, foram coletadas informações dos prontuários eletrônicos das pacientes, incluindo idade, estado reprodutivo, tabagismo, imunossupressão, idade da menarca, idade da sexarca e idade da menopausa.

Como o material biológico analisado havia sido obtido há mais de cinco anos, foi concedida dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, com base na Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Pacientes menores de 18 anos não foram incluídas.

As variáveis qualitativas ordinais foram expressas como frequências absolutas (n) e relativas (%). As variáveis quantitativas contínuas e discretas foram descritas conforme medidas de tendência central e dispersão, de acordo com sua distribuição. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis com distribuição normal, utilizaram-se a média e o desvio-padrão; para distribuições assimétricas, utilizou-se a mediana.

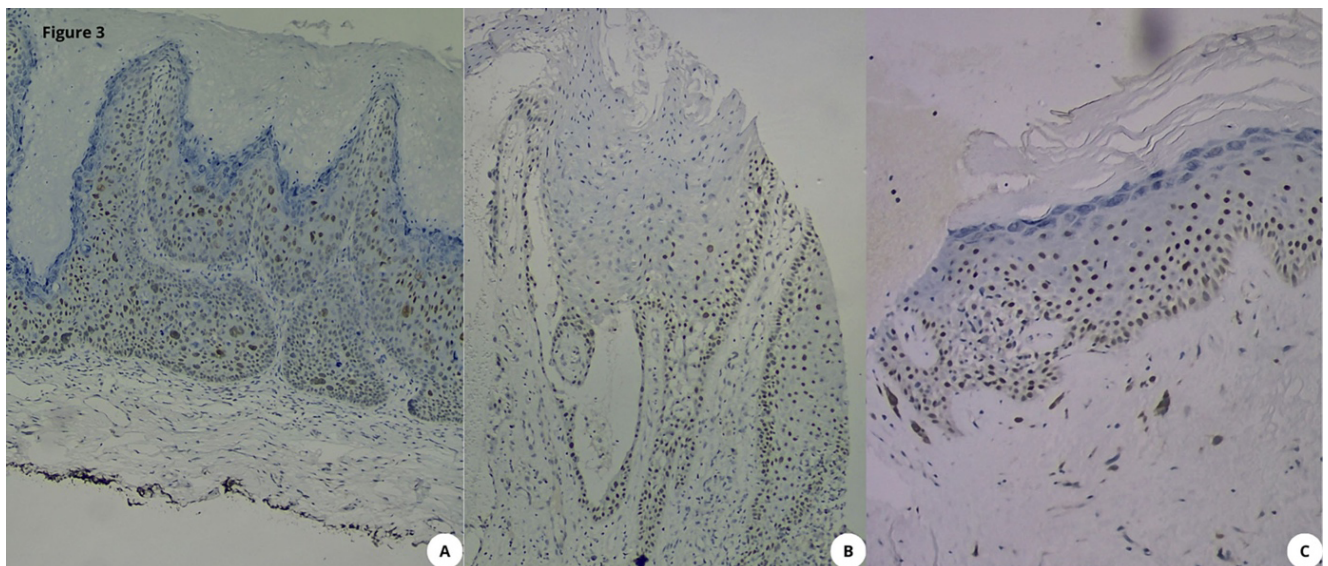
Para a comparação entre os três grupos (HSIL, dVIN e LS), foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas em variáveis contínuas com distribuição normal.

Para variáveis contínuas com distribuição assimétrica, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni. Para variáveis categóricas, foi utilizado o teste do qui-quadrado de Pearson seguido do teste Z com correção de Bonferroni. Os resíduos ajustados foram considerados significativos quando apresentaram valores absolutos superiores a 1,96. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 18 e WINPEPI (Programs for Epidemiologists for Windows) versão 11.65, considerando-se significância estatística quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Um total de 115 pacientes foi incluído no estudo, das quais 81 (70,4%) apresentavam diagnóstico de HSIL, 23 (20%) apresentavam LS e 11 (9,6%) apresentavam dVIN (Tabela 1). Em razão de critérios de qualidade específicos dos TMA, foram excluídos 4/115 fragmentos para p16, 10/115 para p53, 11/115 para CK17 e 3/115 para GATA3 (ausência de controle interno e/ou espessura epidérmica incompleta). As análises foram realizadas de forma específica para cada marcador e refletem apenas os casos considerados adequados para avaliação.

A avaliação diagnóstica das lâminas coradas por HE correspondeu precisamente aos mesmos fragmentos utilizados



Padrões representativos de expressão de GATA3 em lesões intraepiteliais vulvares. (A) HSIL com positividade nuclear difusa para GATA3 (padrão 1). (B) dVIN apresentando expressão reduzida de GATA3 (padrão 2). (C) LS exibindo intensidade variável de expressão de GATA3. Critérios de avaliação: a marcação nuclear de GATA3 foi classificada como padrão 1 (difusa/intensa) ou padrão 2 (reduzida/focal). Fragmentos sem controle interno visível ou com espessura epidérmica incompleta foram excluídos da avaliação de GATA3.

Figura 3. Expressão de GATA3 em HSIL, dVIN e LS.

para a imunohistoquímica, uma vez que o corte de HE foi obtido apenas 4 µm antes da lâmina destinada à imunomarcção. Dessa forma, todos os padrões de coloração relatados refletem diretamente a morfologia observada na respectiva secção corada por HE.

A expressão de p16 foi positiva em 91,1% dos casos de HSIL e negativa em 90% e 100% dos casos de LS e dVIN, respectivamente ($p<0,01$). Portanto, a positividade para p16 foi significativamente mais frequente na HSIL quando comparada aos demais grupos.

Um padrão mutante de expressão de p53 foi observado em 30% dos casos de dVIN, em comparação com apenas 2,7% dos casos de HSIL ($p=0,021$). No grupo LS, um padrão mutante de p53 foi identificado em 10% dos casos, sem diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. O padrão *wild-type* de p53 foi significativamente mais frequente na HSIL quando comparado à dVIN ($p=0,021$).

Em relação ao CK17, a intensidade forte de marcação esteve mais associada à dVIN do que à HSIL, embora sem significância estatística (Tabela 2). A marcação restrita exclusivamente à camada superficial do epitélio foi

significativamente mais frequente na HSIL ($p=0,028$). A distribuição focal ocorreu mais frequentemente na HSIL, enquanto a distribuição difusa foi mais comum no LS ($p=0,032$). A dVIN não apresentou um padrão de distribuição significativamente distinto em comparação aos outros dois grupos.

A intensidade da expressão de GATA3 não diferiu significativamente entre os grupos (Tabela 3). Entretanto, a marcação exclusivamente parabasal foi significativamente mais frequente na dVIN (36,4%) do que na HSIL (2,5%) ($p=0,001$); o grupo LS não apresentou diferenças significativas em relação aos demais. O percentual de células positivas também diferiu significativamente entre dVIN e HSIL ($p=0,022$), sendo que 76,3% dos casos de HSIL apresentaram marcação em $\geq 50\%$ das células, em comparação com 27,6% dos casos de dVIN.

O padrão 2 de marcação do GATA3 (isto é, menos de 25% das células da camada basal positivas) foi observado em 81,8% dos casos de dVIN e em apenas 15% dos casos de HSIL ($p<0,01$), enquanto o padrão 0 ($>75\%$ das células positivas) esteve presente em 47,5% dos casos de HSIL e em apenas 9,1% dos casos de dVIN.

Tabela 1. Características clínicas da população estudada.

Característica	HSIL (%)	DVIN (%)	LS (%)	Valor p
Número de participantes	81 (70,4)	11 (9,6)	23 (20,0)	
Idade média das participantes (anos)	46,47	73,75	59,52	$<0,01$ (a)
Tabagismo				
Presente	34	0	0	0,011 (b)
Ausente	19	5	11	0,015 (b)
Prévio	4	0	4	0,788 (b)
Sem informação	24	6	8	
Imunossupressão				
Presente	47	1	5	
Ausente	21	6	14	0,013 (b)
Sem informação	13	4	4	
Estado reprodutivo				
Mecacme	40	0	2	
Menopausa	23	7	16	0,001 (b)
Sem informação	18	4	5	
Menarca (idade média, anos)	12,64	12,25	12,25	0,821 (a)
Sexarca (idade média, anos)	16,74	19,00	19,86	0,024 (a)
Menopausa (idade média, anos)	45,83	48,57	44,81	0,506 (a)

HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; dVIN: Neoplasia Intraepitelial Vulvar Diferenciada; LS: Líquen Escleroso; (a)Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas; (b) Teste do qui-quadrado de Pearson seguido do teste Z com correção de Bonferroni.

Tabela 2. Expressão imunohistoquímica de CK17 entre os grupos estudados.

CK17	HSIL (%)	DVIN (%)	LS (%)	Valor p
Intensidade da expressão				
Ausente	31 (43,1)	4 (36,4)	4 (20,0)	
Fraca	17 (23,6)	2 (18,2)	4 (20,0)	
Intermediária	14 (19,4)	0	6 (30,0)	
Forte	10 (13,9)	5 (45,5)	6 (30,0)	0,058 (a)
Localização da expressão				
Marcação superficial (escore 1)	15 (36,6)	0	0	0,028 (a)
Marcação superficial e parabasal (escore 2)	23 (56,1)	4 (57,1)	8 (50,0)	
Marcação superficial, parabasal e basal (escore 3)	3 (7,3)	3 (42,9)	8 (50,0)	
Distribuição da expressão				
Marcação focal	28 (68,3)	2 (28,6)	5 (31,3)	0,032 (b)
Marcação difusa	13 (31,7)	5 (71,4)	11 (68,8)	

HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; dVIN: Neoplasia Intraepitelial Vulvar Diferenciada; LS: Líquen Escleroso; CK17: Citoqueratina 17; (a) Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni; (b) Teste do qui-quadrado de Pearson seguido do teste Z com correção de Bonferroni.

Tabela 3. Expressão imunohistoquímica de GATA3 entre os grupos estudados.

GATA3	HSIL (%)	DVIN (%)	LS (%)	Valor p
Intensidade da expressão				
Fraca	9 (11,4)	3 (27,3)	2 (10,0)	0,16 (a)
Intermediária	24 (30,4)	5 (45,5)	10 (50,0)	
Forte	46 (58,2)	3 (27,3)	8 (40,0)	
Localização da expressão				
Camadas basal e parabasal	64 (81,0)	7 (63,6)	16 (80,0)	
Apenas camada parabasal	2 (2,5)	4 (36,4)	1 (5,0)	0,001 (b)
Camadas basal, parabasal e superficial	13 (16,5)	0	3 (15,0)	
Percentual de células marcadas				
0–25%	7 (8,8)	0	1 (5,0)	
26–50%	12 (15,0)	8 (72,7)	6 (30,0)	0,022 (a)
51–75%	27 (33,8)	2 (18,2)	6 (30,0)	
76–100%	34 (42,5)	1 (9,1)	7 (35,0)	
Padrão de expressão				
Padrão 0	38 (47,5)	1 (9,1)	5 (25,0)	
Padrão 1	30 (37,5)	1 (9,1)	10 (50,0)	
Padrão 2	12 (15,0)	9 (81,8)	5 (25,0)	<0,01 (a)

GATA3: Prtoteína de Ligação GATA 3; HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; dVIN: Neoplasia Intraepitelial Vulvar Diferenciada; LS: Líquen Escleroso; (a) Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni; (b) Teste do qui-quadrado de Pearson seguido do teste Z com correção de Bonferroni.

O tabagismo esteve significativamente mais associado à HSIL quando comparado aos demais grupos ($p=0,011$). A imunocompetência foi mais frequente nos grupos LS e dVIN do que no grupo HSIL ($p=0,013$). A maioria das pacientes com LS e dVIN encontrava-se na pós-menopausa, enquanto quase dois terços das pacientes com HSIL estavam em menacme ($p<0,01$).

A idade média diferiu significativamente entre os grupos: 46,47 anos para HSIL, 59,52 anos para LS e 73,75 anos para dVIN ($p=0,01$). A idade média da menarca foi semelhante entre os grupos (aproximadamente 12 anos). Entretanto, a idade da sexarca foi significativamente menor no grupo HSIL (16,74 anos) do que no grupo LS (19,86 anos) ($p=0,024$).

DISCUSSÃO

A maior proporção de casos de dVIN observada neste estudo difere dos achados de Thuijs et al.¹⁸, que relataram que as HSIL são aproximadamente 34 vezes mais frequentes do que as dVIN. Entretanto, os resultados desses autores foram baseados em dados populacionais dos serviços de saúde da Holanda, enquanto o presente estudo utilizou uma amostra de conveniência proveniente de um hospital terciário de alta complexidade. Muitos dos casos de dVIN incluídos na casuística do presente estudo estavam adjacentes a carcinomas espinocelulares invasivos, situação frequentemente manejada em centros de referência desse porte.

As discordâncias entre p16 e p53 foram avaliadas seguindo abordagens diagnósticas contemporâneas baseadas em algoritmos. Lesões com expressão do tipo *block* para p16 associada a um padrão aberrante de p53 não foram automaticamente classificadas como dVIN. Nesses casos, a morfologia foi cuidadosamente reavaliada em busca de características compatíveis com HSIL. Essa estratégia reduz o risco de classificar erroneamente HSIL traumatizadas ou outras lesões como LS ou dVIN com base exclusivamente na imunohistoquímica.

De forma semelhante, a prevalência de LS na amostra foi aproximadamente o dobro daquela relatada no estudo holandês, provavelmente em razão das diferenças nos métodos de seleção dos casos. Os achados referentes à positividade de p16 na HSIL e sua ausência na dVIN e no LS confirmam sua reconhecida associação com a infecção por HPV de alto risco. A elevada taxa de positividade para p16 observada na HSIL (91,1%) está de acordo com uma metanálise que demonstrou prevalência de 86,2% nas HSIL e apenas de 2,0% nas dVIN¹⁹.

A frequência relativamente baixa de padrão mutante de p53 observada na dVIN (30%) contrasta com os resultados de Tessier-Cloutier et al.¹⁷, que encontraram esse padrão em 88,8% dos casos de dVIN. Ainda assim, foram observadas diferenças significativas nos padrões de expressão de p53 entre dVIN e HSIL, corroborando o entendimento de que lesões associadas ao HPV, como a HSIL, tendem a preservar a expressão *wild-type* do TP53²⁰.

Em relação ao CK17, os resultados demonstraram que a marcação superficial e focal é característica da HSIL, enquanto o LS está associado à expressão difusa, em concordância com os achados de Podoll et al.¹⁴. Contudo, não foram identificadas diferenças significativas entre dVIN e LS quanto à expressão de CK17, divergindo dos resultados relatados por Dasgupta et al.¹¹. Essa discrepância pode estar relacionada à perda de amostras ocorrida durante a preparação dos blocos de TMA.

Os padrões de expressão do GATA3 revelaram que a dVIN esteve mais frequentemente associada ao padrão 2 e a menores percentuais de células positivas, em concordância com os estudos de Goyal et al.¹² e Zare et al.¹³. Esses autores também demonstraram que a dVIN tende a apresentar marcação exclusivamente parabasal e expressão reduzida nas células basais, reforçando as observações do presente estudo.

Em relação aos parâmetros clínicos, a associação entre HSIL e pacientes mais jovens, imunossuprimidas e tabagistas reforça conhecimentos já bem estabelecidos na literatura²¹⁻²³. A idade média das pacientes com HSIL observada neste estudo é semelhante à relatada por Joura et al.²⁴. Por outro lado, a idade mais avançada e o estado pós-menopausal das pacientes com dVIN também corroboram os achados previamente descritos.

É reconhecido que determinados padrões de coloração (por exemplo, perdas graduais de expressão e a necessidade de controles internos robustos) são mais adequadamente avaliados em cortes histológicos completos. Buscou-se minimizar essa limitação por meio de

- (i) orientação rigorosa dos fragmentos incluídos no TMA;
- (ii) exclusão específica de amostras sem controle interno ou sem epitélio de espessura completa; e
- (iii) análise da p53 baseada em categorias de expressão com elevada reprodutibilidade. Ainda assim, o desenho baseado em TMA permanece uma limitação do estudo, e os resultados devem ser interpretados como geradores de hipóteses, necessitando validação em larga escala por meio de cortes histológicos completos, especialmente para os padrões de expressão de GATA3 e CK17.

Além das limitações inerentes ao uso de TMA, a análise realizada por um único observador pode introduzir vieses de interpretação dos padrões de coloração. Estudos futuros devem incluir pelo menos dois patologistas experientes, com mecanismo de consenso ou adjudicação. Por fim, o número reduzido de casos de dVIN constitui outra limitação importante, sendo necessários estudos maiores e utilização de cortes completos para validar os achados, particularmente aqueles relacionados aos padrões de expressão de CK17 e GATA3.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo contribuem para ampliar as ferramentas disponíveis para o diagnóstico diferencial das lesões intraepiteliais vulvares. O painel imunohistoquímico avaliado pode auxiliar especialmente na distinção entre dVIN e HSIL, uma vez que todos os marcadores avaliados individualmente apresentaram diferenças significativas de expressão entre essas duas lesões.

Dessa forma, a análise combinada dos padrões de expressão dos quatro anticorpos pode ser útil na avaliação de casos cuja histologia seja ambígua ou duvidosa. A combinação de negatividade para p16, padrão mutante de p53, perda da expressão de GATA3 nas camadas basais do epitélio e manutenção da expressão forte e difusa de CK17 favorece o diagnóstico de dVIN em relação à HSIL.

Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os padrões imunohistoquímicos do LS e da dVIN. Esse resultado negativo é relevante, pois, na prática diagnóstica dos patologistas, a distinção entre LS e dVIN frequentemente representa um desafio, e o presente estudo não foi capaz de fornecer marcadores adicionais que resolvessem essa dificuldade.

Por outro lado, a ausência de diferenças significativas pode estar relacionada ao reduzido número de casos de dVIN incluídos no estudo e à perda de algumas amostras decorrente de problemas técnicos durante a confecção dos blocos de TMA. Assim, estudos futuros devem priorizar a inclusão de um maior número de pacientes com dVIN.

Além do elevado número de perdas parciais de tecido, outra limitação importante do estudo foi o fato de que a revisão diagnóstica e a interpretação da imunohistoquímica foram realizadas por apenas um patologista. Investigações futuras devem incluir pelo menos dois patologistas experientes na análise dos resultados, a fim de minimizar vieses de observação e confirmação.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

RW e LMK: Conceituação, Metodologia, Administração do projeto, Análise formal, Redação – versão original, Redação – revisão e edição. EC: Metodologia, Análise formal, Redação – revisão e edição.

REFERÊNCIAS

1. Bucci L, Pizzato M, Rosso S, Ferretti S. New insights into the epidemiology of vulvar cancer: systematic literature review for an update of incidence and risk factors. *Cancers (Basel)*. 2022;14(2):389. <https://doi.org/10.3390/cancers14020389>
2. Wei KX, Hoang LN. Squamous and Glandular Lesions of the Vulva and Vagina: What's New and What Remains Unanswered? *Surg Pathol Clin*. 2022;15(2):389-405. <https://doi.org/10.1016/j.path.2022.02.011>
3. Hoang LN, Park KJ, Soslow RA, Murali R. Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges. *Pathology*. 2016;48(4):291-302. <https://doi.org/10.1016/j.path.2016.02.015>
4. Gupta S, Ahuja S, Kalwaniya DS, Shamsunder S, Solanki S. Vulval premalignant lesions: a review article. *Obstet Gynecol Sci*. 2024;67(2):169-85. <https://doi.org/10.5468/ogs.23274>
5. Jin C, Liang S. Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia: A Brief Review of Clinicopathologic Features. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(6):768-71. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0019-rs>
6. Thuijs NB, van Beurden M, Duin S, Heideman DAM, Berkhof J, Steenbergen RDM, et al. High-grade vulvar intraepithelial neoplasia: comprehensive characterization and long-term vulvar carcinoma risk. *Histopathology*. 2024;84(2):301-14. <https://doi.org/10.1111/his.15050>
7. Pinto AP, Miron A, Yassin Y, Monte N, Woo TYC, Mehra KK, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia contains Tp53 mutations and is genetically linked to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2010;23(3):404-12. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.179>
8. Köbel M, Kang EY. The Many Uses of p53 Immunohistochemistry in Gynecological Pathology: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the 2020 USCAP Annual Meeting. *Int J Gynecol Pathol*. 2021;40(1):32-40. <https://doi.org/10.1097/pgp.0000000000000725>
9. Pouwer AFW, Van Den Eiden LCG, Van Den Linden M, Hehir-Kwa JY, Yu J, Hendriks KM, et al. Clonal Relationship Between Lichen Sclerosus, Differentiated Vulvar Intra-epithelial Neoplasia and Non HPV-related Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Genom Proteom*. 2020;17(2):151-60. <https://doi.org/10.21873/cgp.20175>
10. Micheletti L, Preti M, Radici G, Boveri S, Di Pumpo O, Privitera SS, et al. Vulvar Lichen Sclerosus and Neoplastic Transformation: A Retrospective Study of 976 Cases. *J Low Genit Tract Dis*. 2016;20(2):180-3. <https://doi.org/10.1097/lgt.0000000000000186>
11. Dasgupta S, Ewing-Graham PC, van Kemenade FJ, van Doorn HC, Noordhoek Hegt V, Koljenović S. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (dVIN): the most helpful histological features and the utility of cytokeratins 13 and 17. *Virchows Arch*. 2018;473(6):739-47. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2436-8>
12. Goyal A, Zhang G, Yang B. Differential expression patterns of GATA3 in usual and differentiated types of vulvar intraepithelial neoplasia: potential diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2018;31(7):1131-40. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0021-y>
13. Zare SY, Fard EV, Fadare O. GATA3 immunohistochemistry as a diagnostic adjunct for differentiated vulvar intraepithelial neoplasia: utility and limitations. *Hum Pathol*. 2023;139:55-64. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2023.07.005>

14. Podoll MB, Singh N, Gilks CB, Moghadamfalahi M, Sanders MA. Assessment of CK17 as a Marker for the Diagnosis of Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2017;36(3):273-80. <https://doi.org/10.1097/pgp.0000000000000317>
15. Borges RB, Mancuso ACB, Camey SA, Leotti VB, Hirakata VN, Azambuja GS, et al. Power and Sample Size for Health Researchers: uma ferramenta para cálculo de tamanho amostral e poder do teste voltado a pesquisadores da área da saúde. *Clinical and Biomedical Research*. 2021;40(4):247-53. <https://doi.org/10.22491/2357-9730.109542>
16. Heller DS, Day T, Allbritton JI, Scurry J, Radici G, Welch K, et al. Diagnostic Criteria for Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia and Vulvar Aberrant Maturation. *J Low Genit Tract Dis*. 2021;25(1):57-70. <https://doi.org/10.1097/lgt.0000000000000572>
17. Tessier-Cloutier B, Kortekaas KE, Thompson E, Pors J, Chen J, Ho J, et al. Major p53 immunohistochemical patterns in in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod Pathol*. 2020;33(8):1595-605. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0524-1>
18. Thuijs NB, van Beurden M, Bruggink AH, Steenbergen RDM, Berkhof J, Bleeker MCG. Vulvar intraepithelial neoplasia: Incidence and long-term risk of vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2021;148(1):90-8. <https://doi.org/10.1002/ijc.33198>
19. Faber MT, Sand FL, Albieri V, Norrild B, Kjaer SK, Verdoodt F. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva. *Int J Cancer*. 2017;141(6):1161-9. <https://doi.org/10.1002/ijc.30821>
20. Yang H, Almadani N, Thompson EF, Tessier-Cloutier B, Chen J, Ho J, et al. Classification of Vulvar Squamous Cell Carcinoma and Precursor Lesions by p16 and p53 Immunohistochemistry: Considerations, Caveats, and an Algorithmic Approach. *Mod Pathol*. 2023;36(6):100145. <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100145>
21. Hantschmann P, Sterzer S, Jeschke U, Frieze K. P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosus. *Anticancer Res*. 2005;25(3a):1739-45.
22. Liegl B, Regauer S. p53 immunostaining in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN). *Histopathology*. 2006;48(3):268-74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02321.x>
23. Sadalla JC, Lourenço SV, Sotto MN, Baracat EC, Carvalho JP. Claudin and p53 expression in vulvar lichen sclerosus and squamous-cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2011;64(10):853-7. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200103>
24. Joura EA, Lösch A, Haider-Angeler MG, Breitenacker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med*. 2000;45(8):613-5.