

PATRICIA ANDREUCCI GOMES

**Líquen escleroso vulvar: estudo dos marcadores Ki-67 e p53
antes e após o tratamento com clobetasol a 0,05%,
testosterona a 2% e um placebo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé

SÃO PAULO

2005

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	6
III. REVISÃO DA LITERATURA	9
1. Líquen Escleroso Vulvar	10
1.1. Histórico	10
1.2. Definição	17
1.3. Etiopatogenia	20
1.4. Evolução Clínica	23
1.5. Histopatologia	25
2. Tratamento no Líquen Escleroso Vulvar	29
2.1. Tratamento com Testosterona	31
2.2. Tratamento com Clobetasol	36
3. Marcadores Celulares	43
3.1. Anticorpo Ki-67	43
3.1.1. Definição	43
3.1.2. Anticorpo Ki-67 no Líquen Escleroso Vulvar	48
3.2. Proteína p53	51
3.2.1. Definição	51

3.2.2. Proteína p53 no Líquen Escleroso Vulvar	57
IV. MÉTODOS	63
1. Casuística	64
2. Avaliação Clínica	65
3. Imunoistoquímica do Anticorpo Ki-67 e da Proteína p53	67
3.1. Leitura das Células Marcadas com Ki-67 e p53	71
4. Análise Estatística	72
V. RESULTADOS	73
1. Avaliação Clínica	74
1.1. Idade e Tempo de Doença	74
1.2. Local da Doença e Doenças Auto-imunes Associadas	75
1.3. Evolução dos Sintomas	76
2. Análise do Anticorpo Ki-67	77
3. Análise da Proteína p53	78
VI. DISCUSSÃO	80
VII. CONCLUSÕES	96
VIII. ANEXOS	98
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

GOMES, P. A. **Líquen escleroso vulvar: Estudo dos marcadores Ki-67 e p53 antes e após o tratamento com clobetasol a 0,05%, testosterona a 2% e um placebo [tese]**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 139p.

O líquen escleroso vulvar é uma doença crônica e benigna, porém apresenta um potencial de malignização para o carcinoma de células escamosas de vulva. Foram estudadas trinta doentes com líquen escleroso vulvar, divididas em três grupos, que fizeram uso tópico de propionato de clobetasol a 0,05%, testosterona a 2% e um placebo, para avaliar a evolução dos sintomas e o comportamento das células marcadas com o anticorpo Ki-67 e a proteína p53 antes e após os tratamentos. Observou-se melhora dos sintomas clínicos com o uso do clobetasol e da testosterona, que foi estatisticamente superior ao placebo ($p < 0,01$). Observou-se diminuição significativa das células marcadas com Ki-67 após o tratamento das doentes com o clobetasol ($p < 0,01$) e com a testosterona ($p < 0,02$). Enquanto, nas doentes que utilizaram placebo, observou-se um aumento do Ki-67. Em relação à análise das células marcadas com a proteína p53 também observou-se diminuição significativa após o tratamento com o clobetasol ($p < 0,01$) e com a testosterona ($p < 0,01$) enquanto no grupo placebo, e observou-se um aumento do p53. Quando se compara a variação do p53 entre os grupos clobetasol, testosterona e placebo observou-se uma diminuição do p53 estatisticamente superior ($p < 0,001$) nas doentes que utilizaram clobetasol. Assim, os resultados mostram uma redução dos marcadores celulares após os tratamentos, e com o p53 a diminuição foi estatisticamente maior no grupo que utilizou clobetasol, sugerindo a eficácia desse tratamento.

Descritores: 1- Líquen escleroso e atrófico, 2- Doenças Vulvares, 3- Antígeno Ki-67, 4- Proteína p53, 5- Marcadores Biológicos, 6- Testosterona, 7- Corticosteróides.

GOMES, P. A. Vulvar lichen sclerosus: a study of markers Ki-67 and p53 before and after the treatment with clobetasol at 0.05%, testosterone at 2% and a placebo [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 139p.

Vulvar Lichen Sclerosus consists of a benign chronic disease, however featuring a malignant potential for vulvar squamous cell carcinoma. The present study targeted 30 patients diagnosed Vulvar Lichen Sclerosus, divided in three groups, and who made topical use of clobetasol propionate at 0.05%, testosterone at 2% and a placebo, so as to assess the evolution of the symptoms and the behavior of the cells marked with antibody Ki-67 and protein p53, before and after the treatments. The administration of clobetasol and testosterone has proven effective in the management of the clinical symptoms, which turned out to be statistically higher than the placebo ($p < 0.01$). The number of cells marked with Ki-67 decreased significantly patients treated with clobetasol ($p < 0.01$) and testosterone ($p < 0.02$), while the number of such cells increased in those patients who made use of the placebo. The number of cells marked with protein p53 also decreased significantly after the treatment with clobetasol ($p < 0.01$) and testosterone ($p < 0.01$), whereas the placebo group revealed an increased p53. When comparing the decrease of the p53 in the clobetasol, testosterone and placebo groups, we noted a decrease of the p53 statistically higher ($p < 0.001$) in patients under clobetasol suggesting a reduction in the cellular markers, after the treatment. As for the p53, the decrease was statistically higher in the group under clobetasol, suggesting the efficacy of the treatment.

Key words: 1- Lichen sclerosus et atrophicus, 2- Vulvar diseases, 3- Antigen Ki-67, 4- Protein p53, 5- Biological Markers, 6-Testosterone, 7- Adrenal cortex Hormones.

I. INTRODUÇÃO

O líquen escleroso é uma doença crônica que acomete pele e mucosas, afeta freqüentemente a região anogenital, com predileção para o sexo feminino (OBERFIELD, 1961), ocorre geralmente após a menopausa e na infância (WALLACE, 1971; AZEVEDO et al., 1994). As mulheres afetadas comumente queixam-se de dor prurido, queimação e dispareunia (BOUSEMA et al., 1994).

A doença clinicamente caracteriza-se por uma pápula rósea ou branco-marfim podendo formar placas com aspecto apergaminhado característico. Na vulva como complicação pode haver atrofia parcial ou completa de pequenos lábios, clitóris, intróito vaginal e meato urinário (OBERFIELD, 1961).

As alterações anátomo-patológicas mais comuns no líquen escleroso compreendem, na epiderme, hiperqueratose com tamponamento folicular, diminuição da camada de Malpighi com degeneração hidrópica da camada basal, na derme superior, edema e homogeneização do colágeno, característica considerada patognomônica da doença, e na derme média, infiltrado inflamatório focal ou em faixa (LEVER; LEVER, 1991).

O líquen escleroso vulvar tem um potencial de transformação maligna para o carcinoma de células escamosas da vulva em torno de 4%. Entretanto, Scurry et al. (1997), ao estudarem as margens cirúrgicas de vulvectomias para o tratamento do carcinoma de células escamosas de vulva, observaram incidência de 48% de líquen escleroso nas áreas adjacentes ao tumor retirado.

Várias foram tentativas de tratar o líquen escleroso. Um tratamento considerado clássico na literatura foi com testosterona a 2% aplicada topicamente. Com o surgimento da teoria auto-imune ganhou força o uso de corticóides potentes, como o clobetasol a 0,05% no tratamento dessa doença (SMITH; HAEFNER, 2004).

Não se sabe se os tratamentos disponíveis conseguem interferir na transformação maligna do líquen escleroso vulvar, pois, mesmo sob a vigência de tratamento, existem relatos na literatura de evolução para o carcinoma de células escamosas de vulva (ROLFE et al., 2001).

O carcinoma de células escamosas de vulva apresenta dois fatores etiológicos importantes: o primeiro, relacionado ao papilomavírus humano (HPV), está presente em doentes jovens com idade inferior a 50 anos; e o segundo está relacionado às mutações gênicas, especificamente à mutação da proteína p53 e está presente em mulheres com mais de 50 anos, após a menopausa (LERMA et al., 1999).

Tratando-se da etiologia da mutação gênica, as doentes podem apresentar história pregressa de doenças inflamatórias da vulva, tais como líquen escleroso, hiperplasia de células escamosas e neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) (VANIN et al., 2002).

Vários autores avaliaram no líquen escleroso vulvar e no carcinoma de células escamosas de vulva a expressão de marcadores celulares, como o anticorpo Ki-67 relacionado com a proliferação celular e a proteína p53 ligada ao controle do ciclo celular para esclarecer o comportamento dessas doenças inflamatórias na evolução do tumor (TAN et al., 1994; LERMA et al.,

1999; SCURRY et al., 1998; VANIN et al., 2002; ROLFE et al., 2001, 2002, 2003; SANTOS et al., 2005; HANTSCHMANN et al., 2005).

Muitos autores têm observado a presença do Ki-67 no líquen escleroso e no carcinoma de células escamosas, porém o índice é maior no tumor quando comparado ao líquen (SCURRY et al., 1998; ROLFE et al., 2002). O mesmo ocorre com a proteína p53 (LERMA et al., 1999; VANIN et al., 2002; ROLFE et al., 2002, 2003; HANTSCHMANN et al., 2005).

Esses marcadores já foram utilizados na literatura para avaliar também o comportamento de outras doenças (SOINI et al., 1994; ELLIS et al., 2002) e principalmente de outros tumores (BERNER et al., 1993), além de avaliarem a eficácia de medicamentos (BROWN; GATTER, 1990).

Até o momento, foram encontrados na literatura estudos que avaliam a expressão desses marcadores celulares no líquen escleroso comparando-os ao carcinoma de células escamosas. Existem apenas dois trabalhos que avaliaram os efeitos dos corticóides tópicos na expressão do Ki-67 e p53 no tratamento do líquen escleroso vulvar, para verificar se o uso do corticóide reduz o risco de transformação maligna (CARDINAL et al., 1993; ROLFE et al., 2002).

Cardinal et al. (1993) avaliaram dez doentes de líquen, apresentando resultados inconclusivos. Rolfe et al. (2002) avaliaram 26 doentes com líquen escleroso vulvar tratadas com corticóides, 22 doentes sem tratamento e dezesseis casos de pele normal, observando aumento do Ki-67 e do p53 nas doentes tratadas comparado com as de pele normal. Quando

compararam o grupo de líquen escleroso tratado ao grupo não tratado observaram aumento significativo apenas com o Ki-67.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento do líquen escleroso vulvar com clobetasol a 0,05% e testosterona a 2% comparados com um placebo, utilizando os parâmetros clínicos e imunoistoquímicos, este último por meio da análise do anticorpo Ki-67 e da proteína p53.

II. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é analisar a eficácia do tratamento do líquen escleroso vulvar com o clobetasol a 0,05%, a testosterona a 2% comparado com um placebo por meio da análise dos seguintes parâmetros:

1. A evolução clínica dos sintomas.
2. O comportamento das células marcadas pelo Ki-67 pelo método imunohistoquímico antes e após o tratamento.
3. O comportamento das células marcadas pelo p53 pelo método imunohistoquímico antes e após o tratamento.

III. REVISÃO DA LITERATURA

1. Líquen Escleroso Vulvar

1.1. Histórico

A imagem da mulher idosa dispaurênica que se obriga à reclusão, por medo de coçar a área genital em público, é uma situação triste. O problema dessas doentes pode não ser curado por completo, mas é necessário buscar uma resposta terapêutica, mesmo que não seja ainda a ideal (FRIEDRICH, 1976).

Um dos primeiros relatos de lesão de coloração branca na vulva e na região oral foi feita em 1875 por Wier, que denominou o quadro estudado de “ichthyosis”.

Em 1885, Breisky descreveu uma degeneração vulvar atrófica de cor esbranquiçada que causava o estreitamento do intróito vaginal e que chamou de kraurose vulvar. O termo origina-se do grego “kraurus”, que significa retração. Essa denominação foi usada para frisar a alteração que envolvia o vestíbulo, lábio menor, clitóris, prepúcio, comissura posterior e períneo, resultando numa estenose do vestíbulo que interferia no coito e no parto.

Pouco depois, em 1887, Hallopeau descreveu em uma doente pápulas pruriginosas coalescentes no tronco e antebraço e áreas de líquenificação na vulva, denominando o quadro extragenital como *lichen planus atrophicus*, pois acreditava que esta entidade era uma variante do líquen plano. A Hallopeau (1887) é geralmente creditada a primeira

descrição clínica da doença que mais tarde ficou conhecida como líquen escleroso.

Em 1888, Schwimmer aplicou o termo leucoplasia (“leucos” = branco, “plasis” = placa) para denominar uma mancha branca, hiperqueratótica pré-maligna na língua e na boca. Subseqüentemente, esse termo foi utilizado para lesões similares que apareciam nas membranas mucosas ou em outras áreas do corpo.

A histologia do líquen escleroso foi formalmente descrita por Darier em 1889. Ele chamou a atenção para uma zona alargada única subepidérmica, em faixa, a qual denominou de esclerose e considerou este achado patognomônico da doença. Em 1928, acreditando que o termo *craurose vulvar* era muito vago, o mesmo autor sugeriu limitá-lo a atrofia e esclerose intensa e progressiva do tegumento mucocutâneo da vulva, que levaria à estenose gradual do orifício vaginal, ao desaparecimento dos pequenos lábios, frênulo, clitóris e achatamento dos grandes lábios (OBERFIELD, 1961).

O termo líquen escleroso vem do grego e descreve uma condição de pele de superfície seca enrugada e descamativa. Às vezes a doença tem exatamente essa aparência, sendo descrita em alguns textos como semelhante à folha de papel de cigarro amassado. O adjetivo *atrófico* adicionado ao líquen escleroso foi adotado por muitos autores no transcorrer da história dessa doença (FRIEDRICH, 1976). A partir de 1920, o termo mais curto ‘líquen escleroso’ começou a aparecer esporadicamente na literatura (MEFFERT et al., 1995).

Em 1920, Taussig estabeleceu a vulvectomia como tratamento de escolha contra a craurose vulvar, por acreditar ser uma alteração pré-maligna (MEFFERT et al., 1995). Em 1923, este autor introduziu o termo vulvite leucoplástica. Acreditava que a vulvite leucoplástica e a craurose vulvar eram duas doenças diferentes. Ele subdividiu a vulvite leucoplástica em tipo hipertrófico e em atrófico, que correspondia à craurose de Breisky (1885). Taussig acreditava que 50% das doentes com lesão branca vulvar desenvolveriam câncer de vulva e que a progressão para uma transformação cancerígena seria inevitável. Esse autor criticava o termo leucoplasia e sugeriu a sua retirada dos textos (TAUSSIG, 1923, 1929). Os estudos de Taussig tiveram muita influência na época (OBERFIELD, 1961; WOODRUFF; BAENS, 1963; KAUFMAN, 1976).

Em 1929, Graves e Smith chamaram a atenção em artigo intitulado “Kraurosis vulvae” para a atrofia caurótica e sua possível transformação maligna. Nessa época, os autores compilaram mais de duas dúzias de termos utilizados como sinônimos de craurose vulvar. Na verdade, nas décadas subseqüentes à descrição de Hallopeau, vários autores “descobriram” o líquen escleroso e deram vários nomes às alterações que observavam. Entretanto, retrospectivamente as lesões tinham a clínica e anátomo-patologia do líquen escleroso (MEFFERT et al., 1995).

Oberfield, em 1961, mostrou que o líquen escleroso era histologicamente idêntico à vulvite leucoplástica, variedade atrófica, e à craurose descrita por Breisky (1885). Analisando 22 casos de líquen escleroso limitado à área anogenital e vulvar, verificou a semelhança clínica

com a chamada craurose vulvar, vulvite leucoplástica ou leucoplasia, termos mais em voga na época. Para ele era impossível diferenciar clinicamente o líquen escleroso, a leucoplasia e algumas doenças inflamatórias na área genital. Tentava mostrar que a craurose vulvar nada mais era do que o líquen escleroso localizado exclusivamente na vulva. Ele criticou os estudos de Taussig (1923, 1929) que, para classificar as lesões da vulva, colocava na mesma categoria muitas alterações de cor esbranquiçada que somente poderiam ser diferenciadas pelo exame anátomo-patológico.

Em 1961, Jeffcoate e Woodcock chamaram a atenção para a discordância que existia entre clínicos e patologistas sobre o significado preciso do termo leucoplasia e sua relação com a atrofia caurótica e com o câncer de vulva. Salientaram, ainda, que a inexistência de uma nomenclatura uniforme dificultava o diagnóstico e o estudo dessas alterações. Eles estudaram 98 mulheres com lesão branca na vulva. Nenhuma tinha câncer na época do diagnóstico, nem desenvolveu malignidade no período de 25 anos de acompanhamento. Concluíram que a vulvectomia de rotina preconizada como tratamento para as lesões brancas era injustificada. Sugeriram que, para as alterações de pele sem causa bem definida, fosse dado o nome de distrofia epitelial crônica. De grande importância na época foi a referência de Jeffcoate e Woodcock de 1961 sobre a utilização da biópsia para investigação diagnóstica e acompanhamento destas lesões (ARAUJO et al., 1996).

Woodruff e Baens, em 1963, sugeriram que as lesões brancas de vulva só poderiam ser diferenciadas pela análise anátomo-patológica.

Propuseram uma terminologia mais específica, diferenciando líquen escleroso de vulvite hiperplástica, esta subdividida em três graus, sendo que o terceiro corresponderia ao carcinoma “in situ”.

Jeffcoate (1961, 1966) assinalou que todos os termos usados por dermatologistas e ginecologistas eram mera variação da resposta epitelial da vulva a um ou mais agentes adversos. Acreditava que o calor e a umidade provocavam uma reação no epitélio vulvar, dando uma aparência esbranquiçada. As diferenças clínicas na aparência da pele distrófica não denotavam, necessariamente, a existência de doenças separadas. Para sustentar o seu ponto de vista, mostrou que quando retirava a pele distrófica da vulva e fazia um transplante de epitélio, as alterações iniciais reapareciam na pele transplantada. Verificou, também, que 50 a 60% das distrofias, tratadas por retirada parcial ou vulvectomia total, recidivavam. Esse autor sugeriu que fosse usado para as lesões clínicas o termo lesão branca, pois leucoplasia era um termo anátomo-patológico. Mesmo as alterações anátomo-patológicas poderiam ser melhor descritas sem a utilização do termo leucoplasia, que deveria ser abandonado. Até então, era comum a utilização da denominação leucoplasia para lesões clínicas e para as alterações anátomo-patológicas.

Gardner, Kaufman, em 1969, concordavam em parte com as idéias de Jeffcoate (1961), no tanto preferiram classificar as várias distrofias com base em uma avaliação anátomo-patológica, como Woodruff, Baens (1963). Desta forma, subdividiram as distrofias em três grandes grupos: 1- distrofia

hiperplástica; 2- distrofia atrófica (líquen escleroso); 3- distrofia mista (líquen escleroso alterado com focos de hiperplasia).

Os conceitos líquen escleroso, craurose vulvar e leucoplasia foram usados paralelamente durante meio século, causando discussões nosológicas e diferentes propostas de nomenclatura, até ser estabelecido que todos se referiam à mesma doença (HEWITT, 1986).

Gardner et al. (1976), no Décimo Congresso Mundial da Federação Internacional de Ginecologistas e Obstetras, em 1970, fundou uma entidade chamada “International Society for the Study of Vulvar Disease” (ISSVD) (KAUFMAN; WOODRUFF, 1976), organização que teve como primeira missão definir e promulgar uma nomenclatura universal das doenças vulvares aceita por dermatologistas, ginecologistas e patologistas. Além desses especialistas, fazem parte da sociedade, imunologistas, venereologistas, epidemiologistas, microbiologistas, virologistas, dentre outros, contando atualmente com representantes de 28 nações (KNEALE, 1988).

Hart et al., em 1975, sugeriram o abandono do termo leucoplasia utilizado na clínica e na anátomo-patologia, concordando com as idéias de Jeffcoate (1966). Apontaram que as lesões brancas consideradas como leucoplásicas quase sempre mostravam no exame anátomo-patológico uma das várias dermatoses benignas, tais como psoríase, líquen plano, dermatite seborréica, entre outras, além do líquen escleroso, doença de Bowen, doença de Paget, displasia e hiperplasia escamosa. Propuseram, também, o abandono do termo leucoplasia com conotação pré-maligna.

Em 1976, representantes da ISSVD de várias especialidades publicaram a “New nomenclature for vulvar disease”, com base em extensos estudos. Concluíram que a terminologia leucoplasia, craurose, líquen escleroso e atrófico e outros dezessete sinônimos deveriam ser abandonados e adotaram o termo distrofia (GARDNER et al., 1976).

Dividiram as distrofias vulvares de acordo com suas características anátomo-patológicas em três grandes grupos:

1- Distrofia hiperplásica, representada histologicamente por proliferação epitelial à custa de acantose, geralmente acompanhada por hiperqueratose de grau variado. A camada granular pode ser proeminente ou não. A inflamação crônica da derme varia de leve a severa. Este grupo se subdividia em outros dois com relação à presença ou ausência de atipia epitelial. Quando presente a atipia pode ser leve, moderada ou severa. Essas alterações ocorreriam em resposta à irritação por causa intrínseca ou extrínseca. Clinicamente, as lesões são róseas ou eritematosas, cobertas com queratina cinza-esbranquiçada, podendo ocorrer liquenificação, fissura e escoriações.

2- Líquen escleroso, caracterizado na epiderme, por um fino epitélio e vacuolização da camada basal, na derme superior aparência homogênea acidófila, acelular e edema, e na derme profunda, infiltrado linfocitário, variando de leve a severo.

3- Distrofia mista (líquen escleroso com focos de hiperplasia epitelial), caracterizada por uma hiperplasia epitelial e características do

líquen escleroso, e que também se subdivide em dois outros, com e sem atipia.

Desde então, a vulvectomia não tem sido mais usada como terapêutica de rotina de alterações benignas, que devem ser tratadas por terapia tópica sempre que possível (FRIEDRICH, 1985).

O termo distrofia hiperplásica não foi aceito unanimemente, tanto que dermatologistas e patologistas sugeriram o termo líquen simples crônico em sua substituição. Outros propuseram a adição de uma categoria de dermatoses benignas, onde seriam incluídas psoríase, líquen plano, e dermatite seborréica (HEWITT, 1986).

No IX Congresso do ISSVD, a terminologia das lesões vulvares benignas foi novamente revisada. O termo distrofia hiperplástica foi abandonado e foi substituído por hiperplasia de células escamosas. O termo distrofia mista foi abandonado, uma vez que se reconheceu que casos de líquen escleroso podem ter áreas hiperplásicas sem implicar em uma entidade diferente. Os casos em que ocorria atipia foram colocados numa outra categoria, a neoplasia intra-epitelial vulvar. Esta categoria foi dividida em I, II e III, correspondendo esta última a uma displasia grave que se sobrepõe ao carcinoma *in situ* (RODKE et al., 1988).

Portanto, a classificação atual das lesões benignas da vulva consiste em: 1- Hiperplasia de células escamosas; 2- Líquen escleroso; e 3- Neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV Grau I, II, III) (RODKE et al., 1988).

1.2. Definição

O líquen escleroso é uma doença crônica pouco freqüente, que pode afetar ambos os sexos, sendo de seis a dez vezes mais freqüente no sexo feminino, com predileção para as áreas genitais e ocorre principalmente em doentes da raça branca (OBERFIELD, 1961; BARBERO, 1988; BOVO, 1996).

A idade média de acometimento nas mulheres é de 50 anos, sendo mais comum na menopausa, e nos homens é de 38 anos (OBERFIELD, 1961; WALLACE, 1971). A doença pode aparecer na infância, correspondendo a 3% dos casos na região vulvar (AZEVEDO et al., 1994), tendo aspecto clínico variável, semelhante ao do adulto, necessitando de acompanhamento a longo prazo (PELISSE et al., 1984). Na menina, as lesões geralmente progridem até a puberdade e regridem espontaneamente (SANCHES; MIHM, 1982).

A incidência do líquen escleroso vulvar é de 1 para cada 300 a 1.000 doentes em um hospital geral (WALLACE, 1971), e a sua prevalência precisa é desconhecida.

Gomes et al., (1994), examinaram 1.372 doentes da Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro durante o período de quatro meses, observando alteração vulvar em 29 doentes (2,1%). Destas, seis apresentaram líquen escleroso vulvar, sendo a segunda patologia mais freqüente, atrás apenas do condiloma acuminado, com oito casos (27,6%).

Goldstein et al. (2005) examinaram 1675 mulheres em uma clínica ginecológica particular por três anos consecutivos, observando incidência de 1,7% dos casos de líquen escleroso, sendo que pelo menos um terço das mulheres com líquen escleroso eram assintomáticas.

O líquen escleroso vulvar tem um potencial de malignização em torno de 4% (HART et al., 1975; SOINI et al., 1994; MEFFERT et al., 1995; SCURRY et al., 1997).

Outros estudos mostraram a coexistência de líquen escleroso e do carcinoma de vulva, numa porcentagem de 0-10%. Contudo, isto não indicou uma relação causal entre as duas doenças. Numa análise com 107 mulheres com líquen escleroso, apenas cinco (1%) desenvolveram carcinoma de vulva. Quando a malignização apareceu na vulva, geralmente ocorreu em áreas de lesões mínimas de líquen escleroso ou áreas isoladas de epitélio vulvar normal (HART et al., 1975).

Segundo observações de Kaufman, Woodruff, em 1976, 1-2% das doentes com distrofia vulvar crônica vão apresentar evolução para o carcinoma. Isto provavelmente ocorrerá nas doentes que apresentarem na avaliação anátomo-patológica uma hiperplasia cutânea com atipia no exame inicial. Na ausência de atipia, o desenvolvimento subsequente de malignização é quase nulo, se for dado à doente o tratamento adequado.

A carcinogênese é um processo múltiplo causado por acúmulo de defeitos genéticos que afetam a regulação do gene, desde o nascimento até a morte da célula. A célula humana normal é diplóide, contendo 46 cromossomos. Uma instabilidade no gene pode causar múltiplas mutações

que são encontradas na maioria dos cânceres. A perda ou ganho de grandes porções de cromossomos, isto é, quando o núcleo celular contém um número anormal de cromossomos, é chamado de aneuploidia.

Estudos mostram que a aneuploidia ocorre em 25% dos casos de líquen escleroso (CARLSON et al., 2000; BEN-HUR et al., 2001).

De qualquer forma, as doentes com líquen escleroso que aparecerem com lesões suspeitas, como espessamento e ulceração, devem ser acompanhadas com exame anátomo-patológico freqüentes, pois o diagnóstico precoce favorece o tratamento (JEFFCOATE, WOODCOCK, 1961; COLLINS et al., 1966; HART et al., 1975; MORENO et al., 1992; SANHUEZA et al., 2004).

As complicações do líquen escleroso vulvar consistem na atrofia, parcial ou quase completa dos pequenos lábios e do clitóris (FIGURA 1, p. 115), da contratura grosseira do intróito vaginal e do estreitamento intenso do meato urinário. No homem ocorre a fimose. Ocasionalmente, em ambos os sexos, podem ocorrer alterações inflamatórias, tais como, maceração, líquenificação, ulceração superficial e também infecções secundárias. Já as lesões extragenitais geralmente só resultam em problemas de ordem estética (MELO et al., 1985).

1.3. Etiopatogenia

A etiologia e a patogenia da doença ainda não são totalmente conhecidas. Alguns doentes apresentam predisposição genética (FRIEDRICH; MACLAREN, 1984; MEYRICH; KENNEDY, 1986; MITCHELL et al., 1986).

O subtipo HLA-DQ-7 foi encontrado nos casos familiares da doença (FRIEDRICH; MACLAREN, 1984; CHAN et al., 2004).

As alterações hormonais têm sido estudadas. Nas mulheres, foram encontrados baixos níveis séricos de deidrotestosterona e androstenediona (FRIEDRICH; KALRA, 1984). A atividade da enzima andrógeno-dependente 5-alfa redutase na pele da região perineal das doentes afetadas mostrou-se diminuída, explicando a relativa eficácia do tratamento tópico com testosterona e a da melhora espontânea nas crianças afetadas (FRIEDRICH; KALRA, 1984; FYNT; GALLUP, 1979).

O papel da auto-imunidade no líquen escleroso ainda não é bem compreendido (CARLI et al., 1991). Muitos estudos têm mostrado uma associação significativa com várias doenças auto-ímmunes em geral, principalmente quando comparadas com um grupo controle (HARRINGTON; DUNSMORE, 1981; MEYRICK et al., 1983). Vários estudos mostraram um aumento de anticorpos séricos órgão-específicos e não-específicos nos doentes afetados (HARRINGTON; DUNSMORE, 1981; DICKIE et al., 1982; MEYRICH et al., 1988).

A incidência de outras doenças auto-imunes em doentes com líquen escleroso é maior quando o início dessa doença ocorre entre 41 e 60 anos, mas não está relacionada com local de aparecimento das lesões (HARRINGTON; GELSTHORPE, 1981).

Em 1971, Wallace relatou que dos seus 380 doentes com líquen escleroso, dez também tinham vitiligo, sugerindo que essa associação poderia ser significativa. Goolamali et al., em 1974, relataram que 40% dos casos de líquen escleroso tinham anticorpos antitireoidianos e 44% tinham anticorpos contra células parietais gástricas, tendo sido associado a acloridria. Harrington e Dunsmore, em 1981, examinaram cinquenta doentes com líquen escleroso e investigaram hipotireoidismo, tirotoxicose, alopecia areata, anemia perniciosa, diabetes melito e vitiligo. Destas, 17 doentes analisadas tinham uma ou mais doenças associadas. no entanto, a análise estatística comparada com um grupo controle das doenças em separado mostrou significância apenas no caso da anemia perniciosa. Todas as doenças auto-imunes pesquisadas em conjunto estavam estatisticamente aumentadas em relação à população em geral (HARRINGTON; DUNSMORE, 1981; MEYRICH et al., 1982).

A teoria auto-imune está relacionada à presença de anticorpos contra antígenos da pele. Recentemente, Chan et al. (2004) encontraram anticorpos circulantes contra a proteína da matriz extracelular (ECM 1) em 75% dos doentes de líquen escleroso. Essa proteína, na epiderme, está relacionada com a diferenciação do queratinócito, e na derme liga-se com os proteoglicanos, funcionando como uma cola biológica. A possibilidade de a

ECM 1 representar um alvo para a imunidade humoral no líquen escleroso é sugerida pelas alterações anátomo-patológicas encontradas na doença, como atrofia da epiderme, degeneração hidrópica na membrana basal e hialinização do colágeno. Essa proteína também se apresenta mutada na lipóido-proteinose, uma genodermatose de herança recessiva, na qual também ocorre espessamento e degeneração da membrana basal (CHAN, 2004).

A coexistência do líquen escleroso com a esclerodermia sugere a existência de agentes etiológicos semelhantes ou processos patológicos intimamente relacionados (MELO et al., 1985). A presença de bactérias cocóides em doentes com esclerodermia generalizada e localizada e o aparecimento delas ocasionalmente no líquen escleroso poderia sugerir uma íntima relação entre essas doenças (CANTWELL, 1984).

A coexistência de líquen escleroso com lesões mucosas clinicamente semelhantes às de líquen plano e a coexistência das duas doenças em um mesmo doente fizeram com que alguns autores discutissem a possibilidade de o líquen escleroso ser uma variante do líquen plano (MARREN et al., 1994).

Doenças infecciosas têm sido citadas como uma possível causa do líquen escleroso causa, mas ainda sem comprovação (BOUSEMA et al., 1994).

1.4. Evolução Clínica

O curso da doença é longo e progressivo, com períodos de quiescência e ocasionalmente com involução espontânea. Após um período assintomático, a doença pode tornar-se novamente ativa (BARKER; GROSS, 1962).

O líquen escleroso vulvar está, geralmente, associado a um prurido intenso (FRIEDRICH; MACLAREN, 1984; SIDERI et al., 1988).

A lesão elementar do líquen escleroso é uma pápula de coloração levemente rósea ou branco-marfim, com uma depressão central, podendo confluir formando placas. Com o tempo, as lesões adquirem o aspecto apergaminhado característico. Podemos observar telangiectasias e púrpuras. Lesões hemorrágicas e bolhosas são raras (ARAUJO et al., 1996).

Nas mulheres, esta entidade geralmente afeta a vulva podendo apresentar prurido, dor, queimação, dispareunia (BOUSEMA et al., 1994), disquesia (WILLIAMS et al., 1966), disúria e sangramento (WALLACE, 1962). A região anogenital na mulher é freqüentemente afetada e pode ser o único local de envolvimento (BARKER; GROSS, 1962).

As meninas se queixam mais de sintomas urinários, isso se deve à inabilidade das crianças em descrever sintomas complexos como prurido ou queimação (COOPER et al., 2004). O líquen escleroso vulvar na infância pode levar a fissuras genitais e úlceras perianais podendo ser confundidas com abuso sexual (WILKINSON, 1994).

Nos homens o líquen escleroso atinge principalmente o prepúcio e a glândula, sendo denominada de balanite xerótica obliterante (MELO et al., 1985), evoluindo freqüentemente para fimose (AZEVEDO et al., 1994).

As áreas extragenitais mais freqüentemente acometidas são a parte superior do tronco, pescoço, axila, antebraços e região periumbilical (ROOK et al., 1992). Entretanto, já foram observadas lesões em outros locais, como no couro cabeludo (FOULDS, 1980), região palmo-plantar (PETROZZI et al., 1979) e mucosa oral (MILLER, 1957; MARREN et al., 1994).

1.5. Histopatologia

As alterações anátomo-patológicas mais comuns do líquen escleroso compreendem, na epiderme, hiperqueratose com tamponamento folicular, diminuição da camada de Malpighi e degeneração hidrópica das células da camada basal. Na derme superior, ocorrem edema e homogeneização do colágeno. E na derme média, há um infiltrado inflamatório focal ou em faixa (LEVER; LEVER, 1991).

A alteração na derme, que Darier (1889) chamou de esclerose e considerou patognomônico da doença, acabou sendo denominada por Wallace e Whimster, em 1951, como hialinização. O colágeno é encontrado desnaturado e, alternadamente, destruído e regenerado em granofilamentos na derme. As fibras elásticas estão parcialmente ou totalmente ausentes na derme superior (MANN; COWAN, 1973). Frances et al. (1983) mostraram pela imunofluorescência direta o desaparecimento do colágeno tipo I, III e IV, como também fibronectina na derme superior e alteração linear da laminina na junção dermo-epidérmica. A atrofia observada no líquen escleroso está relacionada com anormalidades na biossíntese do colágeno (PANIZZON et al., 1990).

Hewitt, em 1986, analisou as alterações epidérmicas e dérmicas de margens cirúrgicas seqüenciais dos espécimes com líquen escleroso provenientes de nove vulvectomias por carcinoma invasivo de vulva. Observou que havia uma variedade grande de alterações, tanto na espessura da epiderme como na derme. Em uma mesma lâmina, as

alterações clássicas anátomo-patológicas do líquen escleroso podiam ser observadas ao lado de outras alterações menos evidentes. Existia grande variação na espessura da epiderme, apresentando papilas dérmicas preservadas ou mesmo alongadas com hiperqueratose; ou atrofia, com diminuição ou desaparecimento das papilas dérmicas, de tal forma que a camada basal se apresentava praticamente numa linha reta. Pode ocorrer degeneração hidrópica da basal e interpretada como um deslocamento intercelular pelo edema dérmico. Desta forma, o epitélio atrófico poderia não representar uma atrofia como até então se acreditava, mas sim, resultado deste edema.

Hewitt (1986) acredita que as alterações dérmicas no líquen escleroso seriam devidas a uma protease tipo elastase que é normalmente encontrada no epitélio vulvar, sendo muito mais ativa na derme das doentes com líquen escleroso. Assim, ocorreria a hialinização superficial do colágeno observada na doença. Essa característica está sempre presente em vários graus, mesmo que seja bem fina ou limitada a membrana basal ou a papila dérmica, numa mesma lâmina ou em suas amostras seqüenciais. Para Hewitt, a hialinização, quando presente, é o único critério anátomo-patológico significativo para o diagnóstico da doença.

A atrofia observada no líquen escleroso está relacionada com anormalidades na biossíntese do colágeno (PANIZZON et al., 1990). Estudos a respeito indicam que não ocorre uma verdadeira atrofia na doença (FRIEDRICH, 1976). A comprovação desses estudos (FRIEDRICH et al., 1964; WOODRUFF et al., 1965) levou a ISSVD a retirar o adjetivo atrófico

como qualificativo do líquen escleroso. Embora exista aumento de ácidos nucléicos, o índice de mitose não está aumentado. Tanto a fosfatase alcalina como a adenosina trifosfatase apresentam-se em quantidade igual ou aumentada em relação ao epitélio normal (MOLLICA et al., 1996).

Pela microscopia eletrônica, as fibras colágenas apresentam grande alteração de diâmetro numa mesma região e alterações grosseiras em outras; a lâmina basal apresenta-se mais freqüentemente espessada, mas também podem ser vistos pequenos buracos ou grandes falhas, ou ainda regiões com áreas de replicação. Hemidesmossomos normais são vistos nos locais da membrana basal espessada, mas não se encontram onde há falta da membrana basal. A elastina apresenta-se em algumas áreas em quantidades superiores à da pele normal, enquanto em outras regiões encontra-se dispersa na derme próxima a fibras colágenas. Podem-se observar fibroblastos com aglomerados de colágeno maduro. Há locais onde há lisossomos ao redor de fibras colágenas, as quais provavelmente estão sendo fagocitadas. Os queratinócitos mostram vários graus de alterações degenerativas ou são normais. Em locais de lesões de líquen escleroso inativo, melanócitos estão presentes em menor número e com alterações degenerativas. Nesse caso, ocorre um número menor de células de Langerhans. Nas lesões ativas, no entanto, não são vistos melanócitos de morfologia normal e células de Langerhans estão em número aumentado. Quanto mais ativo clinicamente o líquen escleroso, menor é a quantidade de melanócitos. Esses parecem estar sendo substituídos pelas células de

Langerhans, que se encontram em número aumentado (MANN, COWAN, 1973).

Estudos com tiamina (WOODRUFF et al., 1965) e acridina laranja (FRIEDRICH et al., 1964), como indutores da localização de DNA e RNA, sugeriram uma atividade destas substâncias maior do que o normal no local da lesão de líquen escleroso. Nesta doença ocorre uma grande concentração dos dois ácidos em todas as camadas de células do epitélio vulvar. Woodruff et al., em 1965, mostraram que o grau de atividade das células no líquen escleroso é muito maior que na pele normal e estão em níveis próximos aos encontrados no carcinoma *in situ*.

2. Tratamento no Líquen Escleroso Vulvar

O líquen escleroso até há pouco tempo era considerado uma doença maligna, necessitando de vulvectomy, e hoje é definido como uma doença benigna, requerendo um tratamento conservador, apesar de apresentar um potencial de malignização em torno de 4% (FRIEDRICH, 1976).

Várias medicações já foram usadas no tratamento da doença:

1. Estrógenos (SODO et al, 1990);
2. Progesterona (JASIONOWSKI, JASIONOWSKI, 1977; 1979);
3. Testosterona (FRIEDRICH, 1985; DI PAOLA, 1971);
4. Vitamina A e derivados (HESSELTINE, 1941; ITALA, 1987; BOUSEMA et al., 1994);
5. Calcipotriol (KREUTER et al., 2002)
6. Cloroquina (BRACCO et al., 1993);
7. Corticóides tópicos (CARLI, 1992);
8. Corticóides intralesionais (DUTTON et al., 1962);
9. Corticóides oclusivos (VOLDEN, 1992);
10. Alcoolização dos nervos sensitivos (WOODRUFF; BABAKNIA, 1979);
11. Vulvectomy (FIGUEROAS CASAS et al., 1973);
12. Denervação vulvar (BRACCO et al., 1993);
13. Radioterapia (MEFFERT et al., 1995);
14. Criocirurgia (AUGUSTUS; MILWARD, 1980);
15. Laserterapia (LAVERY, 1982);

16. Ciclosporina (CARLI et al., 1992);
17. Ajuda psiquiátrica (WILLIANS et al., 1966);
18. Terapia fotodinâmica (HILLEMANNNS et al., 1999);
19. Tacrolimus (BOHM et al., 2003; KUNSTFELD et al., 2003); e
20. Pimecrolimus (SMITH; HAEFNER, 2004).

2.1. Tratamento com Testosterona

Cinberg, em 1945, foi o primeiro a usar a testosterona tópica no tratamento do prurido vulvar associado à atrofia cutânea acometendo a mulher menopausada. Esse autor se baseou na ação proliferativa celular da medicação.

Posteriormente, Friedrich em 1976, revendo os estudos de Cinberg (1945), Richardson, Williams (1966), Zelle (1971), Friedrich (1971), Di Paola (1971), Kaufman et al. (1974), mostrou que das 137 doentes tratadas com testosterona tópica a 2%, 130 apresentaram melhora clínica e sintomatológica das lesões. Esse grau de sucesso, concluiu o autor, foi inigualável comparado aos obtidos com outras terapêuticas experimentadas até então.

Esse mesmo estudo surpreendeu muitos ginecologistas, pois considerava a vulva uma extensão da vagina e, portanto, um órgão estrógeno dependente. Na verdade, a vulva se desenvolve do ectoderma embrionário e é totalmente independente do mesoderma mulleriano, portanto, a resposta hormonal do epitélio vulvar é similar à da pele de outras partes do corpo (FRIEDRICH, 1976).

Muitos pesquisadores têm confirmado que a vulva é um alvo da estimulação andrógena tanto na idade fetal, na infância, na adolescência e na vida adulta, porém não explicando a melhora do líquen escleroso com a ação tópica da testosterona (WILLIAMS et al., 1966; ARAUJO et al., 1996; SMITH; HAEFNER, 2004).

Willians et al. (1966) observaram que a testosterona leva a alterações epidérmicas que sugerem um aumento da capacidade do tegumento em resistir a injúrias e irritação. Esta ação trófica dos andrógenos sobre a epiderme e a grande quantidade de receptores para testosterona na vulva levaram à tentativa desta terapêutica por Araújo et al., em 1996.

Um outro estudo a respeito do epitélio axilar também vulvar mostrou que a testosterona tem um efeito hiperplásico nessas regiões (FRIEDRICH, 1976).

No epitélio vulvar normal, a enzima 5-alfa redutase metaboliza a testosterona em deidrotestosterona, em quantidades muito superiores que as encontradas em outras partes do corpo. As mulheres com líquen escleroso têm deidrotestosterona circulante em níveis baixos, mas não se sabe se é um processo primário ou secundário da doença. Sugere-se que a testosterona tópica daria um excesso de substrato, induzindo a atividade local da 5-alfa redutase (DALZIEL et al., 1991).

Tanto a deidrotestosterona como o androstenediol são biologicamente mais ativos que a testosterona dentro do núcleo das células suscetíveis dos tecidos alvo, mas ambos usados em estudos de líquen escleroso vulvar mostraram-se menos efetivos que a testosterona (PELISSE, 1975).

Os trabalhos são controversos quanto à absorção sistêmica de testosterona a 2% usada topicamente. Estudos de absorção sistêmica em cinco casos de doentes com líquen escleroso em região vulvar não mostraram nenhum aumento do 17-ceto-esteróide urinário ou dos

andrógenos plasmáticos (ZELLE, 1971). Entretanto, há relatos de alterações hormonais em doentes fazendo uso de testosterona (AZEVEDO et al., 1994).

A falta de correlação entre os níveis de andrógenos circulantes, a resposta clínica do líquen escleroso ao uso da testosterona tópica e o desenvolvimento de efeitos colaterais durante o tratamento sugeriram que a absorção cutânea da testosterona tópica é variável. As condições periféricas, possivelmente relacionadas com o número e a saturação dos receptores androgênicos seriam mais importantes para que a testosterona exercesse sua ação do que a concentração plasmática desse hormônio (AZEVEDO et al., 1994).

A testosterona tem efeito trófico positivo, levando ao espessamento cutâneo, secundário à vasodilatação e ao aumento da atividade da glândula sebácea. Promove, também, um aumento na maturação dos fibroblastos em fibrócitos com conseqüente proliferação dérmica (SODO et al., 1990).

Na mulher, o uso da testosterona tópica melhora os sintomas e a aparência do epitélio afetado. Graças à neovascularização da derme esclerótica, há a produção de um epitélio mais róseo. Além disso, ocorre estimulação das glândulas sebáceas. Essas alterações fazem com que a superfície da região afetada perca sua aparência enrugada e brilhante (SODO et al., 1990).

A testosterona tópica também tem mostrado resultados benéficos no homem, sendo usada na balanite xerótica obliterante (AZEVEDO et al., 1994).

Nos dados da literatura, o tempo de melhora dos sintomas do líquen escleroso vulvar com o uso tópico de testosterona variou de uma semana a cinco meses (AGUIAR, 1987).

Um estudo em cinquenta doentes com líquen escleroso vulvar que fizeram uso de propionato de testosterona a 2% tópico, durante um período de 12 meses mostrou que a medicação foi eficaz. Foi avaliado que os melhores resultados eram obtidos após nove meses de uso contínuo da testosterona; após este período, não havia praticamente alteração do quadro clínico com a manutenção do tratamento (AGUIAR, 1987).

Alguns estudos demonstram que a testosterona melhora sintomas clínicos, bem como algumas características anátomo-patológicas, o que é demonstrável em muitos doentes com o restabelecimento das papilas dérmicas (FRIEDRICH, 1976; TREMAINE; MILLER, 1989).

Apesar de muitos estudos confirmarem a eficiência do tratamento com a testosterona, nem todos os casos respondem a esta terapêutica (WOODRUFF; BABAKNIA, 1979).

Pelisse et al., em 1984, alertaram sobre a impossibilidade do uso de testosterona nas crianças com líquen escleroso vulvar, devido a seus efeitos colaterais.

Na verdade, o que inviabiliza o tratamento a longo prazo dos casos efetivos é a existência de efeitos colaterais virilizantes. Em 50% das doentes, há um aumento do clitóris e da pilificação facial preexistente, além de rouquidão, acne, irregularidade menstrual e aumento da libido (FRIEDRICH, 1983; DALZIEL et al., 1991).

Alguns autores referem irritação local com o uso da testosterona (MEFFERT et al., 1995).

Um outro inconveniente é que a testosterona a 2% usada no tratamento do líquen escleroso vulvar não está prontamente disponível, precisando ser formulada (FRIEDRICH, 1976).

A grande maioria das doentes, no entanto, aceita muito bem os efeitos colaterais. Por outro lado, se houver descontinuidade do tratamento por alguma razão, ocorre um retorno gradual dos sinais e sintomas do líquen escleroso, devendo o tratamento ser mantido a longo prazo (FRIEDRICH, 1976).

2.2. Tratamento com Clobetasol

O 17-propionato de clobetasol é um análogo da prednisolona, que tem a fórmula empírica $C_{25}H_{32}O_5ClF$, com peso molecular de 467 Kd. É o mais potente de todos os corticóides atualmente comercializados (OLSEN et al., 1986).

Os corticóides potentes, como o clobetasol, são usados com alta eficácia no tratamento de uma série de dermatoses responsivas à corticoterapia, como psoríase e eczema (BAUMAN, 1985).

O clobetasol tem um efeito antiproliferativo na epiderme e seu uso contínuo pode produzir uma epiderme extremamente adelgada, com a supressão do estrato córneo. Na derme, o fibroblasto é a célula alvo dos esteróides, tornando-se diminuído e ocorrendo a inibição da síntese dos glicosaminoglicanos. Isso leva à diminuição da derme e, conseqüentemente, ao compactamento da mesma. Há uma reestruturação do colágeno e das fibras elásticas (ZHENG et al., 1984). Os corticóides têm ação inflamatória, cicatrizante e, sobretudo, antimitótica, inibindo a proteína de transporte da membrana celular (SODO et al., 1990).

Parish et al., em 1985, sugeriram algumas medidas para o uso seguro do clobetasol: o uso diário por períodos curtos menores que duas semanas, restringindo a dose a menos de 50 gramas por semana; não usar na face, axila, genitália ou área perianal; evitar o uso em crianças ou grávidas; após duas semanas, ou se as lesões melhorarem antes desse período, mudar para uma terapia intermitente ou considerar a mudança para

um corticóide mais fraco; com o uso crônico e intermitente; verificar periodicamente a integridade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal; observar com atenção especial doentes com alteração hepática; não usar sob oclusão; evitar o uso de repetidas prescrições.

Apesar dessas orientações os corticóides tópicos potentes têm sido utilizados em muitas doenças dermatológicas, principalmente em doenças auto-imunes (CUCÉ; FESTA NETO, 2001). Não está claro qual a frequência adequada do uso de corticóide tópico para uma resposta terapêutica eficaz. Para reduzir o risco de efeitos colaterais, um estudo em voluntários observou o afinamento da pele em administrações diárias, bem como em intervalos de tempo. O afinamento da epiderme pelo uso de clobetasol tópico ocorre independentemente do intervalo de aplicação, porém é menor quanto maior for o intervalo. Após o término do tratamento, a atrofia da pele diminui durante os primeiros 13 dias de modo linear (LUBACH et al., 1992).

Estudos usando a hidrocortisona no líquen escleroso mostraram sucesso no tratamento dos sintomas agudos (WOODRUFF; BABAKNIA, 1979). Outros corticóides fracos e moderados passaram a ser usados comumente para o tratamento da doença, levando a melhora do prurido e da secura da mucosa, porém com falha no controle da atividade da doença (WOODRUFF; BABAKNIA, 1979; DALZIEL et al., 1991; CARLI, 1992).

O fato de as lesões melhorarem com corticóides reforçou a possibilidade da etiologia auto-imune (JEFFCOATTE, 1966), o que estimulou o uso de corticóides potentes no líquen no líquen escleroso vulvar (SODO et al., 1990).

Contudo, desde que os corticóides mais potentes começaram a ser comercializados e tiveram sua eficácia comprovada em diversas doenças, um número maior de efeitos indesejáveis foi observado, tais como, estrias, telangiectasias, queimação transitória, formigamento, prurido, piodermites, como a foliculite, fragilidade cutânea e fissuras (WALSH et al., 1993; OLSEN et al., 1986). Há relatos mostrando que os corticóides predisõem a infecções (WALLACE, 1971). A perda da pigmentação da pele pela terapêutica prolongada também pode ocorrer (SODO et al., 1990).

O uso de mais de 50 gramas de clobetasol tópico por semana, no adulto, pode levar a efeitos colaterais sistêmicos (BAUMAN, 1985). A absorção percutânea dos corticóides potentes pode levar a alterações indesejáveis, incluindo a síndrome de Cushing e a supressão do eixo hipotalâmico-pituitário adrenal. Sintomas de insuficiência adrenal podem ocorrer após o uso descontínuo de um corticóide tópico potente usado ininterruptamente por longo período (YONG et al., 1991; WALSH et al., 1993).

A longo prazo um dos maiores problemas observados é a atrofia. (SANCHES; MIHM, 1982). Entretanto, no tratamento prolongado, a atrofia é vista de forma semelhante à que ocorre com corticóides de média potência (OLSEN et al., 1986). Em 1984, Zheng et al., induzindo a atrofia na pele normal de voluntários pelo uso de clobetasol, mostraram o retorno das características normais da derme e epiderme após quatorze dias do término do uso do corticóide. É por isso que, apesar de os corticóides serem

benéficos nos sintomas do líquen escleroso vulvar, há relutância em usá-los (WALLACE, 1971).

Em 1988, Bergman et al. utilizaram corticóides potentes para tratar alterações da vulva. O estudo foi realizado em 15 doentes com distrofia hiperplástica vulvar, tratadas com corticóide fluorado por seis semanas, mostrando a melhora de toda a sintomatologia clínica em 13 doentes, e em 12 observaram reversão do epitélio hiperplásico na avaliação anátomo-patológica após o tratamento. Os autores defenderam que esse tipo de alteração está associado à progressão do câncer de vulva, por isso deve ser feito um vigoroso tratamento com corticóide e também deve haver um seguimento contínuo dessas doentes para que o médico possa surpreender precocemente qualquer transformação maligna.

Carli, em 1992, tratou dez doentes com líquen escleroso vulvar, durante três meses com clobetasol a 0,05% tópico, indicando duas aplicações diárias no primeiro mês e uma aplicação nos dois meses subseqüentes. O autor realizou biópsia nas doentes antes e após o tratamento, observando diminuição do infiltrado inflamatório em todos os casos e de células dendríticas CD1a+ (células de Langerhans). Sete doentes examinadas continuaram a aplicação do medicamento por mais três meses, quando, então, foi realizada uma nova biópsia. O padrão imunológico permaneceu inalterado com relação aos linfócitos dérmicos e aos antígenos da classe II do MHC. Mas, o número de células de Langerhans epidérmicas estava aumentado, próximo ao encontrado no epitélio vulvar normal. Esse estudo demonstrou que um corticóide potente

pode melhorar os aspectos anátomo-patológicos e clínicos do líquen escleroso vulvar e também modificar os parâmetros imunoistoquímicos do sistema imune cutâneo.

Bracco et al. (1993) fizeram um estudo comparativo com duas aplicações tópicas diárias de clobetasol a 0,05%, testosterona a 2%, progesterona 10% e um placebo durante 12 semanas. Tiveram melhora dos sintomas em 75% das doentes que utilizaram clobetasol, em 20% das tratadas com testosterona, em 10% das tratadas com progesterona e 10% com o placebo. As doentes que utilizaram clobetasol foram as únicas que apresentaram melhora anátomo-patológica na comparação das avaliações antes e após tratamento. Os autores consideraram o propionato de clobetasol a terapia de escolha para o tratamento do líquen escleroso vulvar.

Bovo, em 1996, tratou dez mulheres com líquen escleroso vulvar com propionato de clobetasol a 0,05%, em creme, por 120 dias consecutivos, indicando duas aplicações diárias. Observou a melhora clínica e anátomo-patológica das lesões, com melhora da hiperqueratose, da hipergranulose, da hialinização dérmica superficial e do infiltrado inflamatório, após 30 dias de tratamento. Notou, também, que a atrofia do epitélio ficava mais acentuada após 30 e 60 dias, permanecendo inalterada após 90 e 120 dias do tratamento.

Dalziel et al. (1991) avaliaram treze mulheres com líquen escleroso vulvar tratadas com clobetasol a 0,05% durante doze semanas. Todas apresentaram melhora clínica das lesões, redução dos sintomas e da severidade das alterações anátomo-patológicas examinadas (atrofia,

hiperqueratose, intensidade do infiltrado inflamatório, degeneração hidrópica da camada basal e hialinização do colágeno). Duas doentes não completaram o estudo, uma por sentir desconforto com o uso da medicação, apesar do teste de contato ser negativo, e outra por apresentar teste de contato positivo.

No estudo de Dalziel et al. (1991), após o uso de clobetasol a 0,05% durante 12 semanas, 11 doentes utilizaram corticóides moderados e foram seguidas durante seis a 22 meses. Três doentes sentiram a necessidade de voltar a usar o clobetasol para controle dos sintomas e, quando melhoravam, voltavam para corticóides moderados. Sete mulheres utilizaram apenas butirato de clobetasona a 0,05% regularmente ou se houvesse necessidade. Uma doente conseguiu o controle de seus sintomas com o uso de hidrocortisona a 1%. E duas doentes não apresentaram mais evidências clínicas de líquen escleroso. Em todas as outras, a observação clínica após o tratamento foi melhor em relação ao período anterior. Nenhuma doente apresentou erosões ou lesões suspeitas durante o seguimento.

Cooper et al., em 2004, trataram o líquen escleroso vulvar de 255 mulheres e crianças, com corticóides tópicos, sendo que 89% das mulheres e 50% das crianças utilizaram corticóides potentes. Os autores observaram melhora dos sintomas em 244 (96%) doentes, das quais 168 (66%) ficaram livre de sintomas e 76 (30%) mostraram melhora parcial.

Renaud-Vilmer et al. (2004) avaliaram os efeitos a longo prazo da aplicação do clobetasol ;isto mostrou que a remissão está associada com a idade ($p < 0,001$). Houve remissão da doença em 75% nas mulheres com

menos de 50 anos. Entre 50 e 70 anos a remissão foi de 23% e após os 70 anos não houve remissão, provavelmente pela longa evolução da doença.

O uso de corticóides tópicos deve ser considerado no tratamento do líquen escleroso vulvar na infância, uma vez que a androgenoterapia é contra-indicada. Entretanto, nestes casos a supervisão deve ser sistemática (PELISSE et al., 1984).

Apesar da demonstração de melhora nos sintomas e nos aspectos anátomo-patológicos, há mulheres com lesões de longo prazo que se mostram refratárias a qualquer tipo de terapia tópica (WOODRUFF; BABAKNIA, 1979).

Alguns estudos mostram que as doentes voltam a desenvolver os sintomas após a descontinuação do tratamento com o clobetasol, depois de um período variável sem manifestações clínicas (BRACCO et al., 1993).

3. Marcadores Celulares

3.1. Anticorpo Ki-67

3.1.1. Definição

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal descrito por Guedes em 1983 na Universidade de **Kiel**, Alemanha. O clone produtor do anticorpo específico para o antígeno cresceu na **67^a** placa de cultura do tecido. Sua denominação vem, então, da cidade de origem e sua localização na cultura.

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal murino IgG da classe 1 inicialmente gerado contra uma fração nuclear da doença de Hodgkin derivada da linha celular 1,428 (hibridoma de células de Hodgkin e Reed-Sternberg). (BROWN, GATTER, 1990).

É uma proteína não-histona de 345-395 Kd presente no nucléolo das células proliferativas, bem como na cromatina condensada das células mitóticas. Apresenta uma meia-vida de 60-90 minutos (ADRIAENSSENS et al., 1998; ANDERSEN et al., 1998). O gene que codifica o antígeno Ki-67 localiza-se no cromossomo 10 (BROWN; GATTER, 1990).

O anticorpo monoclonal Ki-67 reconhece um antígeno do núcleo que é expresso exclusivamente em células que estão proliferando, e que se encontram nas fases do ciclo celular G1(GAP 1), S(Síntese), G2(GAP 2) e M(Mitose), mas não em G0(Repouso). Desta forma, esse anticorpo tem sido usado largamente como marcador de proliferação celular. Ele se acumula no

núcleo da célula de G1 até a mitose, quando então vai diminuindo rapidamente a intensidade de sua coloração (SOINI et al., 1994).

Utilizando-se anticorpos monoclonais contra o antígeno Ki-67, consegue-se obter taxas que representam o índice de proliferação celular. A expressão nuclear do antígeno Ki-67 em tecido normal reflete a cinética celular (BROWN; GATTER, 1990).

O Ki-67 pode ser utilizado para avaliar as frações de crescimento dos tecidos normais reacionais e neoplásicos (CHANG et al., 1999; WHITTLES et al., 1999). Portanto, tem sido utilizado para identificar os fatores preditivos de neoplasias malignas (SZEKERES; De GIACOMONI, 1994), calcular a cinética celular (GUILLAUD et al., 1991) e estimar a eficácia de novos medicamentos (DE JONG et al., 1995).

Segundo Gerdes, em 1984, o uso do Ki-67 foi um método simples e rápido na determinação da fração de crescimento da célula humana, que tem interesse particular no estudo dos tumores. Brown et al., em 1988, consideraram-o um marcador rápido e eficiente do crescimento tumoral.

Alguns estudos consideram uma boa indicação o uso do Ki-67 na avaliação do potencial terapêutico das drogas antiproliferativas como nas terapias hormonais e no uso do interferon gama (BROWN; GATTER, 1990).

Muitos trabalhos foram realizados utilizando o Ki-67 para estudar seu comportamento nas mais variadas patologias, tais como:

1. Nos carcinomas basocelulares, HEALY et al. (1995) demonstraram que havia um número significativamente maior do Ki-67 nos tumores primários que recidivaram posteriormente e nos tumores mais

agressivos, concluindo que o estudo da proliferação pode ser importante como prognóstico desses tumores. O índice alto do Ki-67 no carcinoma basocelular foi utilizado para diferenciá-lo do tricoepitelioma e também para uma melhor abordagem terapêutica (ABDELSAYED et al., 2000; BROWN, GATTER 2002).

2. Nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados, Sagol et al. (1998) observaram que as células proliferativas, marcadas com o anticorpo Ki-67, apresentaram distribuição aleatória na epiderme, enquanto no queratoacantoma essas células apresentaram distribuição principalmente na periferia. Portanto, os autores concluem que o anticorpo Ki-67 é um parâmetro de diferenciação desses tumores.
3. Nos linfomas não-Hodgkin, Brown e Gatter (2002) demonstraram que existe uma correlação entre o grau histológico e a presença do Ki-67 nestes tumores, podendo utilizá-lo na diferenciação entre linfoma folicular e hiperplasia folicular. Hall et al. (1988) concluíram que a utilização do Ki-67 poderia também trazer informações importantes sobre o comportamento desses tumores.
4. No adenocarcinoma de próstata, Raymond et al. (1988) evidenciaram um índice significativamente maior do Ki-67 comparando-o a hiperplasia prostática. Concluíram que o Ki-67 tem um papel importante no prognóstico do tumor, por ser uma medida de proliferação celular, indicando o crescimento e o grau de invasão tumoral.

5. No carcinoma hepático, Tannapfel et al. (1999) concluíram que a análise do Ki-67 pode ser importante no prognóstico da doença e na determinação de estágios iniciais da hepatocarcinogênese.
6. No adenocarcinoma de colo-retal, Shepherd et al. (1998), analisando o Ki-67, concluíram que este marcador pode ser usado como parâmetro para selecionar os doentes que devem ser submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia.
7. Nos sarcomas sinoviais, Skything et al. (1999) observaram que o Ki-67 tem valor prognóstico.
8. Nos schwannomas e neurilenomas, Kindblom et al. (1998) observaram um índice baixo do anticorpo Ki-67.
9. Nos tumores do sistema nervoso central, Brown e Gatter (1990) observaram que existe uma boa correlação entre o grau histológico do tumor e o índice do anticorpo Ki-67.
10. Nos tumores de mama, Bouzubar et al. (1989) observaram que o alto índice de Ki-67 estava relacionado com a recorrência destes tumores após mastectomia.
11. Na Doença de Paget da vulva, Ellis et al. (2002) concluíram que o Ki-67 pode ser utilizado como marcador prognóstico, enquanto na Doença de Paget da mama não encontraram correlação entre o anticorpo Ki-67 e o grau histológico do tumor.
12. Na colíte ulcerativa, Franklin et al. (1985) analisaram o anticorpo Ki-67 na fase ativa e inativa da doença, e na mucosa intestinal normal, observando índices maiores do marcador na fase ativa da doença.

Andersen et al. (1998), e Brown e Gatter (2002) observaram que na colite ulcerativa o Ki-67 tem valor no diagnóstico, podendo ser utilizado na diferenciação entre displasia e epitélio em regeneração após um processo inflamatório.

13. Em lesões benignas, tais como: psoríase, queratose seborréica, líquen plano e dermatite crônica, Soini et al. (1994) observaram um aumento do Ki-67.
14. O estudo de Hendricks et al., (1994) demonstrou que o Ki-67 tem significância prognóstica no carcinoma de células escamosas de vulva. Quando ocorre imunorreação de distribuição difusa do Ki-67 no núcleo da massa tumoral, a sobrevida das doentes tende a ser menor do que quando ocorre distribuição localizada.

3.1.2. Anticorpo Ki-67 no Líquen Escleroso Vulvar

Cardinal et al. (1993) acompanharam dez doentes de líquen escleroso vulvar para analisar os efeitos do corticóide, clobetasol a 0,05%, antes e após o tratamento por meio do marcador de proliferação celular, o anticorpo Ki-67. Os resultados após o tratamento mostraram em cinco casos aumento do Ki-67, em três diminuição e em dois não houve alteração, porém esses resultados não tiveram significância estatística.

Tan et al. (1994) estudaram dez casos de líquen escleroso vulvar, nove de líquen escleroso vulvar extragenital, sete de vulva normal e cinco de pele extragenital normal para avaliar a expressão do Ki-67. Os resultados mostraram diminuição do Ki-67 no líquen escleroso vulvar, comparado com a pele vulvar normal estatisticamente significativa, e aumento do Ki-67 no líquen escleroso vulvar comparado ao líquen escleroso extragenital não significativa.

Galluppo (1998) estudou 39 doentes com líquen escleroso genital de ambos os sexos para avaliar o índice de proliferação celular por meio do Ki-67 e também os receptores de estrógeno. Os resultados mostraram uma expressão maior do Ki-67 no líquen escleroso quando comparado à pele normal. A expressão do Ki-67 também foi comparada com aspectos anátomo-patológicos do líquen escleroso, observando-se aumento estatisticamente significativo quando comparado com a espessura da

epiderme, no sexo masculino. A autora também sugere uma provável interferência hormonal na patogenia da doença.

Scurry et al. (1998) usaram o marcador de proliferação celular Ki-67 para investigar o potencial de malignização do líquen escleroso vulvar. Os autores compararam a pele normal extragenital com a pele de doentes com líquen escleroso associado ou não a tumor e carcinoma de células escamosas na região genital. Os resultados mostraram quantidades semelhantes de Ki-67 na pele normal e no líquen associado ou não a tumor, e aumento do Ki-67 no carcinoma de células escamosas quando comparado aos outros grupos. A falta de diferença da expressão do Ki-67 na pele normal e no líquen escleroso associado ou não a carcinoma de células escamosas indica que essas condições apresentam um padrão comum de proliferação celular, não afirmando ou negando o potencial maligno do líquen escleroso.

Rolfe et al. (2001) apresentaram um caso de uma mulher diagnosticada com líquen escleroso vulvar aos 35 anos e que aos 46, 55, 57, 58 anos desenvolveu carcinoma de células escamosas em áreas de líquen escleroso vulvar apesar de ter feito uso de tratamento intermitente com diferentes tipos de corticóides quando sentia piora dos sintomas. Aos 62 houve transformação maligna de uma área genital sem líquen. Nos últimos 11 anos de seguimento foram feitas biópsias para os exames anátomo-patológicos e para análise imunoistoquímica de p53 e Ki-67. O aumento de p53 e do Ki-67 foi observado em várias áreas de hiperplasia escamosa e neoplasia intra-epitelial diferenciada, áreas coincidentes com o

desenvolvimento de carcinoma de células escamosas invasivo. A expressão desses marcadores era maior nas áreas de líquen adjacentes ao tumor do que em áreas distantes do tumor. Os autores acreditam que os critérios anátomo-patológicos e imunoistoquímicos mostraram-se úteis, principalmente para identificar áreas que devem ser observadas com mais cuidado ou que devam ser retiradas.

Rolfe et al. (2002) compararam os exames anátomo-patológicos de um grupo 22 mulheres com líquen escleroso vulvar tratadas com corticóide tópico (triancinolona, clobetasol a 0,05%, betametasona a 0,1%, clobetasona butirato a 0,05%; fluocinolona a 0,025%, hidrocortisona butirato a 0,1%, hidrocortisona e hidrocortisona associada a nistatina), 26 casos de líquen escleroso vulvar sem tratamento e 16 casos controle (oito de epitélio genital normal e oito de área genital normal adjacentes a tumores benignos). Houve um aumento do Ki-67 estatisticamente significativo nas doentes tratadas com corticóide quando comparadas com o grupo de epitélio genital normal ($p=0,001$) e houve um aumento do Ki-67 nas doentes com líquen escleroso tratadas com corticóide quando comparadas com as mulheres com líquen escleroso sem tratamento ($p=0,05$).

Rolfe et al., em 2002, sugerem que os corticóides têm efeito no ciclo celular das proteínas no epitélio genital, e em particular no epitélio com alterações devido ao líquen escleroso. O aumento da expressão de Ki-67 com o uso de corticóide tópico sugere um aumento da proliferação celular ao invés da parada do ciclo celular, embora os mecanismos para isso ainda precisem ser elucidados.

3.2. Proteína p53

3.2.1. Definição

O gene p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, banda p13 e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 Kd chamada p53, composta por 393 aminoácidos (SHEA et al., 1992; McNUTT et al., 1994). Esse gene tem sido muito estudado, pois freqüentemente sofre mutação em tumores (GREENBLAT et al., 1994).

A proteína p53 foi descoberta em 1979, nos estudos com células de camundongos murinos e mostrou-se capaz de reagir com extratos de células transformadas, como o anti-soro de animais com tumores induzidos pelo vírus símio (SV40). Formou-se, então, um complexo oligomérico com o produto oncogene chamado grande antígeno T, que tem meia-vida 100 vezes maior e, portanto, detectável imunistoquimicamente (GANNON et al., 1990).

A proteína p53 age como a guardiã do genoma, regulando o ciclo celular em dois pontos principais, na fase G1, que é um ponto de restrição ou partida, e na transição da fase G2 para Mitose (BATES e VOUSDEN, 1996).

Estudos mostram que a proteína p53 acumula-se no citoplasma da célula na fase G1 e migra para o núcleo no início da fase S. A expressão do p53 em muitos tipos de células representa a parada de progressão do ciclo celular, evidenciando sua função de controle (BATES e VOUSDEN, 1996).

No ciclo celular, se existe um dano no material genético de gravidade menor, é dado o sinal de parada na fase G1 para permitir o reparo do DNA por enzimas antes de prosseguir para a fase S. Em caso de dano severo no DNA, não sendo possível o reparo, a proteína p53 natural desencadeia a apoptose (morte programada da célula). A proteína p53 atua em outras proteínas e genes, que por fim inibem o ciclo celular (GREENBLAT et al., 1994).

A inativação da proteína p53 por mutação leva à falência desse mecanismo de reparo de DNA, transmitindo o DNA alterado para as gerações futuras e o p53 é chamado de p53 mutante (GREENBLAT et al., 1994).

O gene p53 é gene supressor de tumor que existe em sua forma natural ou na forma mutante. O p53 natural parece regular negativamente o crescimento e a divisão celular. Em contrapartida, algumas formas mutantes do p53 adquirem função de estimular a divisão celular. Com essas mutações, o p53 desempenha uma função negativa no controle do ciclo celular, inativando a apoptose, ocorrendo a produção de células descontroladas. Por isso, é encontrado comumente nos cânceres humanos (FINLAY et al., 1989; HANTSCHMANN et al., 2005).

A forma natural da proteína p53 possui meia vida de quinze a vinte minutos, já a forma mutante de quatro a 27 horas. A forma mutante é mais estável que a natural, acumulando-se no núcleo e podendo ser detectado imunohistoquimicamente, além de bloquear a forma natural por meio de associação estável entre as duas (GREENBLAT et al., 1994). A expressão

da proteína p53 pode ser considerada uma forma indireta da mutação do gene p53 (DEI TOS et al., 1993).

Ocasionalmente, o p53 pode se estabilizar por meio de ligações com proteínas virais e não virais e também pelo aumento da transcrição, sendo detectado imunistoquimicamente (HALL et al, 1993;GREENBLAT et al., 1994).

Inicialmente, o p53 foi considerado como oncogene, pois sua detecção só era importante nas células neoplásicas. Esse conceito começou a ser mudado por Finlay et al. (1989), que mostraram que a forma natural (não mutante) tinha capacidade inibidora da transformação celular. A função principal do p53 parece ser mediar a resposta ao dano do DNA impedindo, assim, o acúmulo de mutações potencialmente oncogênicas e a instabilidade genômica.

A parada da progressão do ciclo celular foi considerada a maior contribuição na supressão de tumores e recentemente um conjunto de evidências serve de argumento em favor de uma atividade do p53 também na apoptose (HELANDER et al., 1993). Estima-se que há aproximadamente duzentos genes regulados pela proteína p53 no genoma humano. Além disso, essa proteína parece estar envolvida no controle da senescência (WEISS et al., 1995) e na inibição da angiogênese (BATES, VOUSDEN, 1996).

O câncer é resultado de um acúmulo de alterações genéticas, e talvez na maioria dos tumores, mutação de bases no gene p53 seja a mais comum (LEVINE et al 1991).

Muitos estudos foram realizados para entender o significado dessa proteína em diversas doenças:

1. No carcinoma de lábio, Berner et al. (1993) mostraram uma expressão aumentada de p53 em 88% dos casos. Crosthwaite et al. (1996) e Kushner et al.,(1997)observaram que a proteína p53 poderia ser encontrada em lesões labiais malignas, pré-malignas, expostas à luz solar, que seria uma alteração fenotípica precoce na patogenia do câncer labial, concluindo que a expressão alta do p53 provavelmente é um evento precoce na patogênese do carcinoma de lábio. Portanto, alertam para que os doentes com lesões benignas ou pré-malignas, tais como líquen plano labial e queilite actínica, sejam seguidos com mais cautela quando a positividade do p53.
2. No carcinoma espinocelular da língua, Atula et al. (1996) analisaram as proteínas p53 e bcl-2 pelo método imunoistoquímico em doentes com menos de 40 anos, observando que esses doentes têm evolução clínica, prognóstico e índice do p53 semelhantes aos doentes acima dessa faixa etária com a mesma doença, concluindo, portanto, que a proteína p53 é um marcador prognóstico do carcinoma de língua.
3. No Sarcoma de Kaposi clássico, Bergman et al. (1996) realizaram o estudo desses tumores pela identificação imunoistoquímica do p53 e concluíram que o p53 não tem uma função significativa na progressão e evolução desse tumor.

4. Nos tumores de pele:

El-Dery et al (1993), estudando o melanoma, sugeriram que nessa doença a mutação mais freqüente que pode ocorrer é nos genes regulados pela proteína p53 ou nos mediadores regulados por ela. Entretanto, Lassam et al. (1993), analisando a atuação do p53 no desenvolvimento do melanoma, chegaram à conclusão que essa proteína não pode ser considerada um marcador para identificar doentes com alto risco de desenvolvimento da doença, sendo a expressão de p53 um evento tardio na progressão desse tumor.

McGregor et al. (1992) realizaram um estudo imunoistoquímico em 72 tumores epidérmicos e lesões pré-malignas: 24 carcinomas basocelulares, 22 carcinomas espinocelulares, 12 queratoacantomas, cinco doenças de Bowen, nove queratoses actínicas, seis verrugas virais e seis peles normais da região do abdômen. Os autores observaram a expressão do p53 em 46% dos carcinomas basocelulares, em 50% dos carcinomas espinocelulares, 64% dos queratoacantomas, 80% das doenças de Bowen, 55% das queratoses actínicas, e ausência na verruga viral e na pele normal. Além disso, observaram a presença do p53 nos queratinócitos basais displásicos, localizados na pele foto-exposta adjacente aos carcinomas basocelulares.

Inohara et al. (1996) avaliaram a expressão do p53 em 12 carcinomas espinocelulares cutâneos, dez melanomas malignos, sete histiocitomas fibrosos malignos, nove queratoses seborreicas, 11 nevus nevocelulares e seis histiocitomas fibrosos e na pele normal de dez indivíduos saudáveis. O

p53 estava presente apenas nos tumores malignos, nos carcinomas espinocelulares, em seis de 12 casos, e nos melanomas malignos, em três de dez casos.

Mansoor et al. (1996) estudaram retrospectivamente 175 carcinomas espinocelulares cutâneos para avaliar a expressão do p53 utilizando anticorpos monoclonais DO-1. Concluíram que a expressão da proteína p53 não mostrou importância prognóstica.

Rady et al. (1992), avaliando 14 biópsias de carcinoma basocelular, constataram mutações em 50% delas, sugerindo que a luz ultravioleta poderia atuar como um fator carcinogênico específico.

DEI TOS et al., (1993) demonstraram presença do p53 em 65% de tumores do tecido mole, em 21% de tumores de grau intermediário e em 45% de lesões benignas. Trata-se de um dos primeiros trabalhos que demonstram a expressão do p53 em lesões benignas/reactivas. A heterogeneidade das lesões benignas estudadas (granuloma piogênico, hemangiomas e quelóides) sugere a ocorrência de mecanismos diferentes para a presença do p53.

5. E nas lesões benignas inflamatórias da pele: psoríase, queratose seborréica, líquen plano, dermatite crônica, Soini et al. (1994) observaram a presença do p53, mas com expressão muito menor do que quando comparada a expressão do p53 encontrada em tumores, e também observaram ausência do p53 na pele normal.

3.2.2. Proteína p53 no Líquen Escleroso Vulvar

Cardinal et al. (1993) avaliaram a expressão do p53 em dez casos de líquen escleroso vulvar antes e após o tratamento com clobetasol tópico. Os resultados mostraram em seis casos ausência da expressão do p53 antes e presença após o tratamento, em três casos presença antes e ausência após, e em um caso ausência antes e após o tratamento. Portanto, esse estudo dos efeitos dos corticóides tópicos no ciclo celular do líquen escleroso genital, por meio da análise do p53, mostrou-se inconclusivo (Cardinal et al. 1993).

Tan et al. (1994) analisaram dez doentes com líquen escleroso vulvar para identificar a expressão do p53 nesta doença. Os resultados mostraram um aumento significativo do p53 no líquen escleroso vulvar quando comparado a pele normal da região genital e também quando comparado ao líquen escleroso da região extragenital, mas este último resultado não foi significativo.

Kagie et al. (1997) avaliaram a expressão do p53 no carcinoma de células escamosas da vulva e em lesões pré-malignas como líquen escleroso e hiperplasia de células escamosas, neoplasia intra-epitelial vulvar e pele normal para definir se o p53 pode ser usado um parâmetro prognóstico. Os resultados mostraram alta expressão do p53 nos carcinomas comparados as lesões pré-malignas, e ausência do p53 na pele normal de mulheres saudáveis. No entanto, os autores não puderam provar que

a expressão do p53 é um fator de prognóstico para o carcinoma de células escamosas da vulva.

Soini et al. (1999) avaliaram a expressão da proteína p53 em 40 casos de líquen escleroso vulvar utilizando o anticorpo policlonal CM-1 para detectar o p53. Os resultados mostraram ausência do p53 na pele normal da vulva e uma expressão baixa do p53 em 73% dos casos de líquen escleroso. Os autores discutem que o acúmulo de p53 provavelmente ocorre pela forma natural do p53 já que não são visualizadas alterações displásicas que possam sugerir uma lesão pré-maligna.

Lerma et al. (1999) avaliaram a proteína p53, o pRb, a presença do papilomavírus humano (HPV) utilizando PCR e ploidia das células por meio de análise de imagens, em 71 casos de carcinoma espinocelular vulvar invasivos, 18 casos de neoplasia intra-epitelial vulvar e 21 casos de líquen escleroso. Concluíram que os métodos convencionais como estudo anátomo-patológico, estadiamento do tumor, estudo dos linfonodos, invasão perivascular e perineural, ainda mantêm valor estatístico prognóstico nos carcinomas de vulva. Todos os casos de líquen escleroso estudados eram diplóides, HPV e p53 negativos, mas positivos para pRb. O p53 aparece positivo como um evento tardio do câncer vulvar, mas pode ocorrer antes da invasão tumoral. A falta da expressão do pRb pode ocorrer na neoplasia vulvar, e não parece ter papel importante no prognóstico do carcinoma de células escamosas da vulva.

Vanin et al. (2002) estudaram 29 casos de carcinoma de células escamosas associados ao líquen escleroso vulvar, mas negativos ao HPV,

uma vez que este tem sido relatado como fator de risco para o câncer de vulva. Além de 37 casos de líquen escleroso vulvar sem carcinoma, dez casos de líquen escleroso não genital e 12 casos de epitélio vulvar normal. Procuraram nesses casos a proteína alvo E6 do papilomavírus Humano (TP53) e, por degradação e dedução, assumiram que a mesma só apareceria em um câncer HPV negativo se houvesse anulação somática do p53 e perda subsequente do alelo. O TP53 foi evidente em 72% dos cânceres vulvares, 48% no epitélio adjacente ao carcinoma vulvar e mínimo em amostras normais. No líquen escleroso variou de quase nulo e foi aumentando progressivamente no líquen escleroso não genital, líquen escleroso genital e líquen escleroso vulvar ($p < 0,0001$). Esse trabalho sugere que o TP53 é elevado no líquen escleroso vulvar. A alteração estava ligada ao cromossomo heterozigoto 17p em 74% dos carcinomas de vulva, 47% dos casos de líquen escleroso adjacente ao carcinoma. Apenas 31% dos cânceres e 7% das áreas adjacentes estavam relacionados à mutação do p53. Foram observadas 74% de mutações nas áreas de líquen escleroso adjacentes ao tumor, bem como nas áreas de carcinoma de células escamosas de vulva.

Rolfe et al. (2002) estudaram utilizando 64 lâminas de exames anátomo-patológicos de um grupo de 22 mulheres com líquen escleroso vulvar tratado com corticóides tópicos (triancinolona, clobetasol 0,05%, betametasona 0,1%, clobetasona butirato 0,05%; fluocinolona 0,025%, hidrocortisona butirato 0,1%, hidrocortisona e hidrocortisona associada a nistatina), 26 casos de líquen escleroso vulvar sem tratamento e 16 casos

controle (oito de epitélio genital normal e oito de área genital normal adjacentes a tumores benignos). O estudo mostrou uma expressão aumentada do p53 no grupo de líquen escleroso tratado com corticóide quando comparado com a pele genital normal ($p=0,011$). Houve um aumento do p53 no grupo tratado com corticóide comparado com o grupo de líquen escleroso não tratado ($p=0,18$), sem significância estatística.

Rolfe et al. (2003) analisaram as mutações do gene do cromossomo p53 e a expressão do p53 nos casos de líquen escleroso, hiperplasia de células escamosas e carcinomas de células escamosas. Os achados sugerem que as mutações que se desenvolveram no líquen escleroso e na hiperplasia de células escamosas são intrínsecas à evolução clonal que leva ao carcinoma de células escamosas. O tipo de mutação detectado é mais provável que tenha ocorrido por alterações celulares endógenas do que por exposição a agentes carcinógenos.

Santos et al. (2004) identificaram os marcadores celulares p16 e p53 em lesões pré-malignas e malignas da vulva, para determinar se o marcador p16 pode ser eficiente para diferenciar as duas formas do carcinoma de vulva: neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV) e carcinoma de células escamosas da vulva invasivo. Os resultados mostram alta expressão do p16 nos tumores relacionados ao papilomavírus humano e negatividade no líquen escleroso, na hiperplasia de células escamosas. O p53 estava presente nos tumores (NIV grau III, diferenciado e no carcinoma de células escamosas com queratinização) e nas lesões pré-malignas (líquen escleroso e na hiperplasia de células escamosas). Os autores concluíram que o p16 é

um marcador específico para as neoplasias relacionadas ao HPV e a negatividade do p16 no líquen escleroso e na hiperplasia de células escamosas confirma que o HPV não está relacionado com a etiopatogenia dessas doenças.

Hantschmann et al. (2005) avaliaram as alterações do p53 na carcinogênese vulvar examinando a expressão do p53 no câncer de vulva, na neoplasia intra-epitelial vulvar, líquen escleroso (associado ou não a carcinoma de células escamosas da vulva) e hiperplasia de células escamosas (associado ou não a carcinoma de células escamosas da vulva). Encontraram expressão do p53 em 40% dos casos de líquen escleroso e hiperplasia escamosa e em 90% dos casos quando estavam associados ao tumor. Nas doentes com neoplasia intra-epitelial vulvar, 77% apresentaram a expressão para o p53. Tumores com baixa expressão do p53 estavam associados com mulheres com idade inferior a 50 anos ($p < 0,01$) ou tumores de características basalóides ou condilomatosas ($p < 0,015$). Concluíram que a proteína p53 está presente em tumores queratinizados, em lesões precursoras e em desordens com elevado risco para desenvolver o carcinoma de células escamosas da vulva. Acreditam que a mutação do p53 ocorre precocemente na carcinogênese vulvar e pode ser um marcador útil, especialmente nas lesões com elevado risco para desenvolver carcinoma.

Hantschmann et al. (2005) acreditam que os carcinomas queratinizados da vulva, que ocorrem na mulher acima dos 50 anos, geralmente estão associados a líquen escleroso ou hiperplasia de células

escamosas, doenças inflamatórias que podem sofrer transformação maligna, como já foi discutido anteriormente por outros autores.

A alta expressão do p53 nos tumores, no líquen escleroso e nas áreas adjacentes a tumores poderia mostrar uma importante função do mecanismo molecular na transformação carcinogênica dessas desordens. Esta interpretação poderia sugerir um risco maior de desenvolvimento do câncer de vulva pela mutação do p53 (HANTSCHMANN et al., 2005).

Hantschmann et al. (2005) acreditam que o p53 identificado é o p53 mutante.

IV. MÉTODOS

1. Casuística

No período de abril a setembro de 1997, foram examinadas 230 doentes do Setor de Patologia Vulvar Benigna da Clínica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Das 230 doentes examinadas, 65 apresentavam diagnóstico clínico de líquen escleroso. Dessas, foi selecionado um grupo de trinta que apresentavam lesão branca na vulva, sem tratamento prévio há pelo menos três meses.

Excluíram-se mulheres grávidas, com antecedentes de radioterapia prévia e medicação local ou sistêmica hormonal, bem como retinóides locais ou sistêmicos durante o período de três meses que antecedeu este estudo.

Foi pesquisado e tratado, quando necessário, qualquer possível fator agravante como diabetes, hipotireoidismo, infecção, alergia, ou outras doenças.

As idades das doentes variaram de 39 a 81 anos, sendo a idade média 62,4 anos.

Do grupo estudado, dezoito (60%) doentes eram brancas, 12 (40%) não brancas e 26 (86,6%) eram menopausadas (QUADRO 1, p.102).

2. Avaliação Clínica

Os sintomas clínicos mais importantes que fizeram com que as doentes buscassem tratamento ou fossem encaminhadas ao setor foram: prurido, dor, dispareunia, ardor e queimação. As doentes com líquen escleroso extragenital concomitante não apresentavam nenhum sintoma nas lesões.

O tempo de duração dos sintomas relatados variou de três meses a 50 anos, com média de 8,5 anos (QUADRO 1, p.102).

As doentes responderam a um questionário antes e após o tratamento, o qual foi graduado de 0 a 5, de acordo com a intensidade dos sintomas (TABELA 1 A, B, C p.99). Os resultados foram posteriormente avaliados.

Das trinta doentes estudadas, apenas duas apresentaram líquen escleroso na região extragenital, o caso 6 na região inframamária e o caso 13 na perna (QUADRO 2, p.105).

Foram verificadas as seguintes associações com outras doenças: quatro (13,3%) apresentaram quadro anterior exclusivo de alopecia areata (casos 9, 12, 16 e 30); dois (6,6%) apresentavam vitiligo (casos 3 e 4); dois (6,6%) apresentavam diabetes (casos 11 e 28); dois (6,6%) apresentavam hipertireoidismo (casos 1 e 5); um (3,3%) anemia megaloblástica (caso 19); um (3,3%) lúpus eritematoso (caso 21); um (3,3%) artrose (caso 22), e um (3,3%) apresentou alopecia areata e vitiligo (caso 14) (QUADRO 2, p.105).

As doentes foram orientadas durante o período de estudo em relação aos cuidados gerais com higiene pessoal, ou seja, evitar o uso de papel higiênico, perfumes, desodorantes íntimos, talcos, medicações tópicas e também evitar banhos de assento freqüentes com água muito quente. Foi solicitado que utilizassem roupas íntimas mais largas de algodão e preferencialmente brancas. Estas orientações também foram dadas por outros autores (KAUFMAN, WOODRUFF, 1976; SODO et al., 1990).

Durante o estudo, foi contra-indicado o uso de outras aplicações tópicas, bem como o uso de hormônios por via oral ou parenteral. Nenhuma cirurgia, exceto a biópsia da região, foi programada.

3. Imunoistoquímica do anticorpo Ki-67 e da proteína p53

Após a confirmação anátomo-patológica do líquen escleroso, as doentes foram divididas aleatoriamente em três grupos:

- 1º) Um placebo, o “**cold cream**” do Hospital das Clínicas,
- 2º) O **17-propionato de clobetasol a 0,05%**,
- 3º) A **testosterona a 2%** em vaselina sólida.

As doentes utilizaram as medicações tópicas duas vezes ao dia durante um período de três meses.

Elas foram submetidas a uma biópsia na primeira etapa, isto é, antes do tratamento, para confirmar o diagnóstico de líquen escleroso e para a análise imunoistoquímica das células marcadas com Ki-67 e p53.

Na segunda etapa, as doentes foram submetidas a outra biópsia, realizada após 120 dias de tratamento, para uma segunda análise imunoistoquímica das células marcadas com Ki-67 e p53.

A biópsia foi realizada no centro da pele clinicamente mais afetada sob anestesia local com xilocaína a 2% utilizando-se pinça *punch* de 4 mm.

Todas as doentes foram previamente avisadas de que estavam fazendo parte de um estudo, das possibilidades de efeitos colaterais da terapêutica proposta e consentiram na realização das biópsias, antes e depois do tratamento (Termo de Consentimento , p114).

Os fragmentos para exame anátomo-patológico foram fixados em formol a 10% e processados pelas técnicas histopatológicas de rotina, corado pela hematoxilina-eosina e examinados na microscopia ótica.

Este mesmo fragmento parafinado foi utilizado para análise imunoistoquímica do Ki-67 e do p53.

A técnica de identificação do anticorpo Ki-67 e da proteína p53 consiste no método imunoistoquímico, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos:

1. Ki-67 - MIB-1 - código M7240,
2. p53 - clone DO7 - código M7001.

A técnica de visualização do anticorpo Ki-67 e da proteína p53 consiste na coloração pela técnica de Imunoperoxidase em tecido fixado (embebido em parafina):

1. Após a coleta da biópsia o material foi fixado imediatamente em solução de formalina neutra tamponada a 10%:

Formalina 37-40% (pura)	100,00 ml
Água destilada	900,00 ml
Fosfato de sódio, monobásico	4,0 ml
Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	6,0 ml

2. Os fragmentos parafinados foram cortados com espessura de 3 micra em lâminas de cortes parafinados cortados e pescados em lâminas tratadas

com amino propil trietoxisilane (Sigma A-3648), permaneceram na estufa a 60°C, durante o período mínimo de 24 horas.

3. As lâminas foram desparafinadas em três trocas de xilol e posteriormente hidratadas.
4. Efetuou-se a quebra das ligações aldeídicas (desmascaramento dos antígenos) por meio do aquecimento dos preparados anátomo-patológicos imersos em tampão de citrato (solução de ácido cítrico 0,01M pH=6,0).
5. Foram colocados no microondas em dois ciclos de dez minutos em potência máxima.
6. Foram lavados em água destilada e com três trocas de PBS (solução tampão salina fosfato) de cinco minutos.
7. Efetuou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10V (3ml de H₂O₂ em 100ml de PBS) e foram realizadas três trocas de dez minutos.
8. Os cortes foram novamente lavados em água destilada, com quatro trocas de PBS;
9. Adicionou-se o **anticorpo primário** diluído em BSA 1% (solução de albumina bovina) em PBS e incubou-se por uma noite;
10. Foram lavados em solução de PBS, efetuando-se três trocas de cinco minutos.
11. Secou-se ao redor dos cortes e acrescentou-se o **anticorpo secundário** biotinelado por 40 a 40°C em câmara úmida.
12. Foram lavados em PBS, efetuando-se três trocas de cinco minutos.

13. Após secar ao redor dos cortes, acrescentou-se a estreptoavidina conjugada com peroxidase 40°C por um hora.
14. Foram lavados em PBS e revelada a reação com tetracloridrato de diaminobenzina à 0,04% em PBS, filtrados e acrescentados 6µl de peróxido de hidrogênio a 20V à solução reveladora e as lâminas foram mergulhadas durante quatro minutos.
15. Foram lavados em água destilada;
16. Contracolorou-se com hematoxilina de Herris por dois minutos;
17. Foram lavados em água, desidratados e montados em meio permanente.

3.1. Leitura das Células Marcadas com Ki-67 e p53

As lâminas preparadas foram submetidas a uma análise de imagens para a contagem de células de Ki-67. Utilizamos o programa Quantimet 500 Colour System QwimV02 (desenvolvido pela Leica Cambridge Ltd.), em um microcomputador Pentium III, equipado com interface de vídeo multimídia, do qual faziam parte um microscópio Leica Diastar e câmara de vídeo JVC TK-1280V-color interligados.

A epiderme foi colocada na posição horizontal para que fosse visualizada em cada campo excluindo-se a camada córnea e a derme superficial. Foram avaliados cinco campos aleatórios com um aumento de 200 vezes. As células marcadas com Ki-67 foram reconhecidas e demarcadas pela tonalidade. A área correspondente às células marcadas pelo Ki-67 foi medida em μ^2 e posteriormente realizada a análise aritmética das medidas de cada campo (FIGURAS 2 e 3, p. 116).

O mesmo procedimento foi efetuado para a análise das lâminas das células marcadas com o p53 (FIGURAS 4 e 5, p. 117).

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-Protocolo de Pesquisa nº 219/03 29/05/2003.

4. Análise Estatística

Para análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas:

1. Análise de variância, por postos, de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1988), com o objetivo de comparar os grupos clobetasol, testosterona e placebo em relação aos valores do Ki-67 e do p53, observados antes do tratamento, e também as idades e tempo de doença.

A mesma análise foi utilizada para comparar os três grupos acima em relação às diferenças percentuais ($\Delta\%$) observadas entre os períodos antes e após tratamento.

Para o cálculo do $\Delta\%$ aplicou-se a fórmula:

$$\Delta\% = \frac{\text{Valor Antes} - \text{Valor Após}}{\text{Valor Antes}} \times 100$$

2. Teste de Wilcoxon (SIEGEL, 1988), para a finalidade de comparar, separadamente, cada um dos três grupos, os valores observados nos períodos antes e após tratamento.

3. Teste da partição do Quiquadrado para as tabelas 2 x N (COCHRAN, 1954) com o propósito de comparar os grupos de tratamento em relação à evolução, local da doença e presença de doenças associadas.

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

V. RESULTADOS

1. Avaliação Clínica

1.1. Idade e Tempo de Doença

A mediana da idade das doentes que fizeram uso de placebo foi de 61 anos, no grupo clobetasol foi de 60 anos, e no grupo testosterona foi de 62,5 anos (QUADRO 1, p. 102; TABELA 3, p. 103; GRÁFICO 2, p. 104).

A mediana do tempo de doença no grupo do placebo foi de quatro anos, no grupo clobetasol foi de três anos e no grupo testosterona foi de 8,5 anos (TABELA 3, p. 103; GRÁFICO 3, p. 104).

1.2. Local da Doença e Doenças Auto-imunes Associadas

As mulheres do grupo testosterona apresentaram lesões exclusivamente na vulva em 100% dos casos. O mesmo ocorreu em 90% das mulheres que utilizaram placebo e clobetasol (QUADRO 2, p.105; GRÁFICO 4, p.106)..

As mulheres do grupo placebo e clobetasol apresentaram doenças auto-imunes associadas em 50% dos casos e nas mulheres do grupo testosterona em 40% (QUADRO 2, p.105; GRÁFICO 5, p. 106).

As considerações sobre a idade e tempo de doença, local e doenças associadas não fazem parte do objetivo do nosso trabalho, mas foram colocadas aqui como dados adicionais.

1.3. Evolução dos Sintomas

Nas dez doentes do grupo placebo houve melhora em 40% das mulheres: quatro tiveram uma diferença de uma unidade na graduação entre a sintomatologia inicial e final (casos 2, 3, 4 e 5). Cinco não tiveram alteração da sintomatologia antes e após o tratamento (casos 1, 6, 7, 8 e 10) e uma teve piora de uma unidade (caso 9) (TABELA 1A, p. 99; TABELA 2, p. 100 e GRÁFICO1, p. 101).

Nas dez doentes do grupo clobetasol, 100% apresentaram melhora da sintomatologia: quatro tiveram melhora de uma unidade na graduação entre a sintomatologia antes e após o tratamento (casos 12, 13, 14 e 17); quatro tiveram melhora de 2 a 3 unidades (casos 11, 16, 18 e 19); e duas tiveram melhora de 4 ou 5 unidades (casos 15 e 20) (TABELA 1B, p.99; TABELA 2, p.100 e GRÁFICO 1, p.101).

Nas dez doentes do grupo testosterona, a taxa de melhora da sintomatologia foi de 80%: duas não apresentaram alteração da sintomatologia antes e após o tratamento (casos 21 e 25), seis doentes tiveram diferença de uma unidade na graduação entre a sintomatologia antes e após (casos 23, 24, 26, 27, 28 e 30), e duas tiveram uma melhora de duas unidades (casos 22 e 29) (TABELA 1C, p. 99; TABELA 2, p. 100 e GRÁFICO 1, p.101).

2. Análise do Anticorpo Ki-67

Os valores da mediana da porcentagem de área ocupada pelo Ki-67 mostraram um aumento no grupo placebo após o tratamento (antes 0,14; após 0,26) (TABELA 4 p.107; GRÁFICO 6 p.108 e GRÁFICO 7 p.109).

O valor da mediana da diferença de percentual ($\Delta\%$) dos períodos antes e após $[(\text{antes-após})/\text{antes} \times 100]$ calculados a partir dos períodos antes e após foi de $-28,50\%$ (TABELA 4, p. 107; GRÁFICO 6 p.108 e 7, GRÁFICO p.109).

No grupo clobetasol houve uma diminuição do Ki-67 após o tratamento (antes 0,25; após 0,14) e $\Delta\%$ de 42% (TABELA 4 p.107; GRÁFICO 6 p.108 e GRÁFICO 7 p.109).

No grupo testosterona também houve uma diminuição da mediana da porcentagem de área do Ki-67 após o tratamento (antes 0,26; após 0,19) e com $\Delta\%$ de $26,50\%$ (TABELA 4 p.107; GRÁFICO 6 p.108 e GRÁFICO 7 p.109).

3. Análise da Proteína p53

Os valores da mediana da porcentagem de área ocupada pelo p53 mostrara aumento no grupo placebo após o tratamento (antes 1,21; após 1,43) e o valor da mediana da diferença de percentual ($\Delta\%$) dos períodos antes e após foi de - 4,50 % (TABELA 5, p. 110; GRÁFICO 8 p.111 e GRÁFICO 9, p.112).

No grupo clobetasol houve uma diminuição do p53 após o tratamento (antes 1,09; após 0,25) e $\Delta\%$ de 70,50% (TABELA 5, p. 110; GRÁFICO 8 p.111 e GRÁFICO 9 p.112).

No grupo testosterona também houve uma diminuição da mediana da porcentagem de área do p53 após o tratamento (antes 0,77; após 0,54), com $\Delta\%$ de 29,00% (TABELA 5, p. 110; GRÁFICO 8 p.111 e GRÁFICO 9, p.112).

VI. DISCUSSÃO

O líquen escleroso vulvar é uma doença que ocorre com mais freqüência em mulheres brancas menopausadas com idade média de 50 anos. Na literatura o curso da doença é longo , com períodos de quiescência e atividade e ocasionalmente com involução espontânea (BAKER, GROSS, 1962).

Neste trabalho a idade média das doentes estudadas foi um pouco mais elevada, 62,4 anos, sendo que 18 (60%) eram brancas, 26 (86,6%) eram menopausadas, e em média apresentavam sintomas da doença há 8,5 anos (QUADRO 1, p.102).

Em relação à área anatômica acometida, 28 (93,3%) doentes apresentavam lesão apenas em região vulvar e duas (6,7%) apresentavam lesão extragenital; o caso 6 na região inframamária, e o caso 13 na perna (QUADRO 2, p.105; GRÁFICO 4, p.106).

Em relação às doenças associadas, 14 doentes (46,6%) apresentavam outras doenças associadas, sendo que quatro (13,3%) apresentaram alopecia areata, duas (6,6%) vitiligo, duas (6,6%) diabetes, duas (6,6%) hipertireoidismo, uma (3,3%) anemia megaloblástica, uma (3,3%) lúpus eritematoso, uma (3,3%) artrose e uma (3,3%) alopecia areata e vitiligo concomitantemente (QUADRO 2, p. 105; GRÁFICO 5,p. 106).

O líquen escleroso aparece muitas vezes associado a doenças auto-imunes. Nas mulheres com líquen escleroso, as doenças auto-imunes são mais freqüentes quando comparadas com a população geral, porém, se cada grupo de doença auto-imune for analisado separadamente, apenas a

anemia perniciosa mostrou significância estatística (HARRINGTON, DUNSMORE, 1981; MEYRICH et al., 1982).

Recentemente, Chan et al. (2004) encontraram anticorpos circulantes contra a proteína da matriz extracelular (ECM 1) em 75% dos doentes de líquen escleroso.

A introdução da testosterona tópica em 1945 por Cinberg promoveu um grande impulso na terapêutica do líquen escleroso vulvar. Muitos estudos confirmam a eficácia do tratamento com esta medicação (AGUIAR, 1987), mas nem todos os casos respondem a ela (WOODRUFF, BABAKNIA, 1979). Além disso, seu uso a longo prazo é muitas vezes inviabilizado por seus efeitos colaterais virilizantes (FRIEDRICH, 1983; DALZIEL et al., 1991) e, pela mesma razão, em crianças seu uso é contra-indicado (PELISSE et al 1984).

Historicamente, o uso de corticóides tópicos fracos e moderados no líquen escleroso vulvar mostrou melhora dos sintomas, porém com falha no controle da atividade da doença (WOODRUFF, BABAKNIA, 1979). Apesar de benéficos nos sintomas houve relutância na utilização de corticóides mais potentes devido a seus efeitos colaterais locais e sistêmicos (WALSH et al., 1993; OLSEN et al., 1986; WALLACE, 1971; SODO et al., 1990; BAUMAN, 1985; YOUNG et al., 1991; SANCHES; MIHM, 1982). Orientações para o uso seguro de corticóides potentes incluíam evitar a região genital (PARISH et al., 1985).

Aos poucos, resultados de estudos foram confirmando que o uso do clobetasol produzia melhora clínica com controle dos sintomas da doença e

no aspecto anátomo-patológico do líquen escleroso vulvar (DALZIEL et al., 1991; CARLI, 1992; BRACCO et al., 1993; CARLI et al., 1994; BOVO, 1996).

As trinta doentes de líquen escleroso foram estudadas para verificar a eficácia do tratamento por meio da análise da evolução dos sintomas e do comportamento das células marcadas pelo Ki-67 e p53. Para isso, foram divididas aleatoriamente em três grupos, utilizaram duas aplicações diárias de clobetasol a 0,05%, testosterona a 2 % e um placebo.

Após essa divisão verificamos que os grupos foram homogêneos quanto a idade e ao tempo de doença (TABELA 3, p.103; GRÁFICO 2, p.104); local de acometimento da doença (GRÁFICO 4, p.106) e doenças associadas (GRÁFICO 5, p.106), através da análise estatística dos dados.

As mulheres com líquen escleroso vulvar apresentam sintomas variáveis: prurido, dor, queimação, dispaurenia, disquesia, disúria e sangramento (WILLIANS et al., 1966; BOUSEMA et al., 1994).

Neste trabalho, o teste do Quiquadrado aplicado para avaliar a evolução dos sintomas mostrou que a porcentagem de melhora das mulheres que utilizaram clobetasol foi de 100% e de testosterona 80%. Esses dois grupos não diferiram entre si – sem significância estatística – e tiveram resultados significativamente maiores do que os observados no grupo placebo com 40% de melhora de sintomas (TABELA 2, p.100;GRÁFICO1 p.101).

Um dos fatores que puderam promover a melhora das doentes que utilizaram o placebo foi a mudança de hábitos de higiene que propusemos a todas as doentes no início do estudo. Na avaliação subjetiva feita pelas

doentes antes e após o estudo, introduzimos um sistema de 0 a 5 para verificar a melhora ou não dos sintomas de cada uma. As mulheres que fizeram uso de clobetasol apresentaram melhora dos sintomas superior às do grupo da testosterona, apesar de esses dados não terem significância estatística (TABELA 1A,B,C, p.99 ; GRÁFICO 1, p.101).

Nossas observações com relação aos sintomas foram semelhantes às de outros autores relatadas na literatura, como os autores a seguir elencados.

Bracco et al. 1993 fizeram um estudo comparativo com duas aplicações tópicas diárias de clobetasol a 0,05%, testosterona a 2%, progesterona 10% e um placebo durante doze semanas. Tiveram uma melhora dos sintomas em 75% das doentes que utilizaram clobetasol, em 20% das tratadas com testosterona, melhora em 10% das tratadas com progesterona e 10% com o placebo. As doentes que utilizaram clobetasol foram as únicas que apresentaram melhora anátomo-patológica na comparação das avaliações antes e após o tratamento. Os autores consideraram o propionato de clobetasol a terapia de escolha para o tratamento do líquen escleroso vulvar.

Dalziel et al. (1991) trataram treze mulheres com líquen escleroso vulvar durante doze semanas com duas aplicações tópicas diárias de clobetasol a 0,05% e observaram melhora clínica e anátomo-patológica. Esses autores continuaram o seguimento das doentes por um período subsequente de 6-22 meses com uso de corticóides moderados para

continuar o controle da doença. O estudo não mostrou evidências de efeitos colaterais como infecção local ou atrofia (DALZIEL et al. 1991).

Durante o período do nosso estudo, nenhuma doente apresentou efeito colateral ou sintoma que necessitasse a interrupção das substâncias propostas. Não houve evidência clínica que o uso do clobetasol predispusse a infecção ou dermatite de contato. O mesmo já foi observado por Dalziel et al. (1991) e Bergman et. al. (1998).

O aparecimento de estrias é outro efeito indesejável dos corticóides tópicos. As doentes que fizeram parte deste estudo não apresentaram essa alteração, mas uma das 230 doentes que foram examinadas apresentava quadro clínico de líquen escleroso vulvar e estrias na face interna da coxa pelo uso continuado de clobetasol. Como era a única medicação que aliviava seus sintomas, fazia uso indiscriminado da medicação. A doente não quis fazer parte deste estudo.

O uso tópico da testosterona pode produzir irritação local (MEFFERT et al., 1995), No entanto, nenhuma das doentes mencionou este efeito colateral. Azevedo et al., em 1994, já atestavam que os efeitos colaterais da testosterona em doentes com líquen escleroso vulvar geralmente são bem tolerados. Nos casos deste estudo, também não houve efeitos virilizantes nas doentes, isso provavelmente pelo pouco tempo de uso da testosterona. Durante nosso estudo uma doente com líquen escleroso fazia uso contínuo de testosterona tópica e apresentava hipertrofia de clitóris, e não foi incluída na nossa casuística. Apesar do efeito colateral, a doente preferia continuar

usando a medicação pela melhora sintomática, não fazendo queixas do efeito colateral.

Estima-se que 4% dos casos de líquen escleroso malignizem. Por outro lado, revisões de espécimes anátomo-patológicos de vulvectomias para tratamento do carcinoma de células escamosas mostraram que 48% das doentes apresentavam lesões de líquen escleroso nas áreas adjacentes ao tumor retirado (SCURRY et al., 1997).

A procura de novas estratégias que possam reconhecer e tratar mulheres com predisposição à transformação maligna e se possível diminuir essa predisposição evitaria tratamentos agressivos e mutilantes.

Na última década muitos estudos foram feitos procurando encontrar métodos bioquímicos e moleculares para definir doentes de risco (KAGIE et al., 1997).

Neste estudo procurou-se avaliar dois marcadores imunoistoquímicos, o anticorpo Ki-67, que é uma proteína presente nas células em proliferação celular, e o p53, que é uma proteína responsável pelo controle do ciclo celular. Observamos o comportamento das células marcadas nas doentes com líquen escleroso vulvar antes e após o tratamento com clobetasol a 0,05%, testosterona a 2% e um placebo para verificar a eficácia destes tratamentos.

O comportamento do Ki-67 na análise de Kruskal-Wallis não evidenciou diferença significativa entre os três grupos, no período antes do tratamento (mediana placebo 0,14; clobetasol 0,25; testosterona 0,26), mostrando assim homogeneidade dos grupos (TABELA 4 p. 107).

Ao analisar separadamente cada grupo, o teste de Wilcoxon mostrou uma diminuição significativa dos valores do Ki-67, após o tratamento, com o clobetasol ($p < 0,01$) e com a testosterona ($p < 0,02$), quando comparado aos valores antes do tratamento. No entanto, com o placebo não houve diferença significativa (TABELA 4, p.107, GRÁFICO6, p.108)..

Ao comparar a variação da expressão do Ki-67 (?%) entre os grupos, a análise de Kruskal-Wallis mostrou que a diminuição do Ki-67 observada com o clobetasol e com a testosterona não apresentou significância estatística o aumento do Ki-67 pelo placebo também não foi significativo (TABELA 4, p.107, GRÁFICO 7,p.109) .

A diminuição do Ki-67 poderia significar que o uso dessas medicações acarretaria uma diminuição da proliferação celular e este resultado foi mais intenso nas mulheres que utilizaram o clobetasol. Porém, esse dado não teve significância estatística.

Após o uso do placebo houve um aumento da área ocupada pelo Ki-67, portanto haveria mais células em proliferação após doze semanas, sugerindo a evolução natural da doença.

Vários autores encontraram a expressão do Ki-67 no líquen escleroso, no entanto o objetivo desses trabalhos foi a tentativa de elucidar sobre o potencial de malignidade da doença, já que o anticorpo Ki-67 é uma proteína que está aumentada em vários tumores malignos (TAN et al., 1994; SOINI et al., 1994; SCURRY et al., 1997; 1998; SANTOS et al., 2004; HANTSCHMANN et al., 2005).

Um dos aspectos que pôde ser observado na análise anátomo-patológica dos indivíduos com líquen escleroso é uma atrofia importante. Apesar de a atrofia sugerir uma diminuição da atividade da doença, estudos com tiamina (WOODRUFF et al., 1965) e acridina laranja (FRIEDRICH et al. 1964), como indutores do DNA e RNA, mostraram uma atividade dessas substâncias maior do que o normal em todas as camadas do epitélio vulvar em doentes com líquen escleroso, com índices próximos aos encontrados no carcinoma *in situ* (WOODRUFF et al. 1965).

As células positivas para o Ki-67 encontram-se apenas nas camadas basais e parabasais do epitélio e sua expressão está aumentada em relação ao epitélio da vulva normal (SOINI et al., 1994, GALLUPO, 1998). Contudo, o trabalho de Scurry et al. (1998) encontrou quantidades semelhantes do Ki-67 no líquen escleroso em relação à pele normal não genital (sem significância estatística), sugerindo que o resultado encontrado foi devido à degeneração hidrópica da camada basal que ocorre na doença.

Scurry et al. (1998) não encontraram diferenças significantes do Ki-67 quando compararam áreas de líquen escleroso associado ou não ao carcinoma de células escamosas com áreas de pele normal. Mas, em áreas de zona de transição de carcinoma de células escamosas e áreas de líquen escleroso, houve aumento significativo do Ki-67 ($p=0,0007$). Em doentes com líquen escleroso sem associação com carcinoma, nas áreas em que o líquen escleroso era mais espesso, a quantidade de células positivas para o Ki-67 era maior do que em áreas de epitélio mais fino, mas sem significância estatística. Acreditam que algumas áreas espessas de líquen escleroso

ocorra devido à hiperplasia de células escamosas ou que o líquen simples crônico tenha provocado o aumento do Ki-67, ou ainda que não existe a distinção entre líquen simples crônico e hiperplasia de células escamosas. Com base nesse trabalho a contagem de células marcadas pelo Ki-67 não afirma ou nega o potencial maligno do líquen escleroso.

O trabalho de Rolfe et al. (2002) compara áreas de líquen escleroso vulvar tratadas com diferentes corticóides tópicos, casos de líquen escleroso vulvar sem tratamento e 16 casos controles. Os resultados mostraram um aumento do Ki-67 estatisticamente significativo nas doentes tratadas com corticóide quando comparadas ao grupo de epitélio genital normal ($p=0,001$) e houve um aumento do Ki-67 nas doentes com líquen escleroso tratadas com corticóide quando comparadas com as mulheres com líquen escleroso sem tratamento ($p=0,05$). Os autores sugerem que o uso de corticoides tópicos promove um aumento da proliferação celular ao invés de uma parada no ciclo celular.

Rolfe et al. (2002) analisam mulheres que fizeram uso de diferentes tipos de corticóides e não só o clobetasol, além de o tempo de uso de cada um deles não estar especificado. As doentes não tratadas eram diferentes, já o nosso trabalho avalia as mesmas doentes antes e após o tratamento.

Nosso trabalho mostra a diminuição do Ki-67 no líquen tratado comparado com o grupo placebo (grupo não tratado), sendo um resultado estatisticamente significativo ($p<0,01$). Em contrapartida, o trabalho de Rolfe et al. (2002) mostrou um aumento do Ki-67 no líquen tratado comparado ao grupo não tratado, sem significância estatística ($p=0,05$).

Cardinal et al. (1993) avaliaram os efeitos do clobetasol 0,05% antes e após o tratamento por meio do marcador de proliferação celular, o anticorpo Ki-67. Os resultados após o tratamento mostraram em cinco casos aumento do Ki-67, em três casos diminuição e em dois casos não houve alteração. Porém, esses resultados não tiveram significância estatística.

A expressão do p53 é encontrada no epitélio escamoso de doenças inflamatórias não malignas e não neoplásicas, embora a positividade destes núcleos seja bem menor do que em tumores malignos, uma vez que a expressão aumentada da proteína p53 é um achado comum em muitos tumores malignos (KAGIE et al., 1997).

O comportamento do p53 na análise de Kruskal-Wallis não evidenciou diferença significativa entre os três grupos, no período antes do tratamento (mediana placebo=1,21; clobetasol=1,09; testosterona=0,77), mostrando assim homogeneidade dos grupos (TABELA 5, p.110).

Ao analisar separadamente cada grupo, o teste de Wilcoxon mostrou uma diminuição significativa dos valores do p53, após o tratamento com o clobetasol ($p < 0,01$) e com a testosterona ($p < 0,01$), quando comparados aos valores antes do tratamento. No entanto, com o placebo não houve diferença significativa (TABELA 5, p. 110, GRÁFICO 8, p. 111).

Ao comparar a variação da expressão do p53 (?%) entre os grupos, a análise de Kruskal-Wallis mostrou que a diminuição do p53 observada com a testosterona não apresentou significância estatística e o aumento p53 pelo placebo também não foi significativo. Entretanto, foi significativa a diminuição promovida pelo clobetasol ($p < 0,001$)(TABELA 5, p. 110, GRÁFICO 9, p.112).

O estudo de Rolfe et al., em 2002, avaliou o exame anátomo-patológico de mulheres com líquen escleroso vulvar tratadas com corticóides tópicos de diferentes potências, mostrando um aumento do p53 no grupo tratado com corticóide comparado com o grupo de líquen escleroso não tratado sem significância estatística ($p=0,18$), e estatisticamente significativo ($p=0,011$) quando comparado com a pele normal.

Esse trabalho analisa mulheres que fizeram uso de diferentes tipos de corticóides, sem tempo especificado e tratava-se de doentes diferentes, enquanto nosso trabalho avalia as mesmas doentes antes e após o tratamento.

Rolfe et al. (2002) mostraram aumento significativo do p53 no líquen escleroso tratado com corticóide em relação em relação à pele normal ($p=0,011$), e encontraram um aumento do p53 no grupo tratado com corticóide comparado com o grupo de líquen escleroso não tratado, mas sem significância estatística. Nosso trabalho mostra uma diminuição significativa do p53 no líquen escleroso tratado com corticóide ($p<0,001$).

Soini et al. (1994) analisaram o p53 no tratamento a curto prazo (um, três e oito dias) com corticóide potente (betametasona duas vezes ao dia) da pele normal do braço de dois voluntários do sexo masculino. Não houve expressão do p53 antes e após o tratamento com corticóide.

Cardinal et al. (1993) avaliaram a expressão do p53 no líquen escleroso vulvar antes e após o tratamento com clobetasol tópico. Os resultados mostraram em seis casos ausência da expressão de p53 antes e

presença após o tratamento, em três casos presença antes e ausência após e um caso ausência antes e após. O resultado desse estudo foi inconclusivo.

Em nosso trabalho fizemos medições quantitativas do p53 por meio da área e utilizamos o clone DO-7, não podendo diferenciar o p53 natural do p53 mutante.

A expressão do p53 pode ser considerada uma forma indireta da mutação do gene p53 (DEI TOS et al., 1993). Sabe-se que o p53 mutante tem meia vida mais longa e, por isso, é mais fácil de ser detectado imunistoquimicamente e é a forma mais comum encontrada nos tumores humanos (FINLAY et al., 1989).

Estudos mostraram que a aneuploidia ocorre em 25% dos casos de líquen escleroso. Os queratinócitos do líquen escleroso vulvar podem ter um fenótipo proliferativo e exibir marcadores de progressão para neoplasia como o p53 e apresentarem aneuploidia do DNA (CARLSON et al., 2000; BEN-HUR et al., 2001).

O líquen escleroso vulvar é uma dermatose crônica cicatricial que poderia iniciar ou promover a carcinogênese, explicando a coexistência com o carcinoma de células escamosas de vulva. Os queratinócitos do líquen escleroso expressam p53 e essa expressão poderia estar envolvida precocemente na patogenia da doença (BEN-HUR et al., 2001).

Hantschmann et al. (2005) sugerem que a expressão do p53 encontrada em tumores queratinizados da vulva, áreas adjacentes a tumores, no líquen escleroso e na hiperplasia de células escamosas poderia mostrar uma importante função do mecanismo molecular do p53 na

transformação carcinogênica dessas desordens. Essa interpretação poderia sugerir um risco maior de desenvolvimento do câncer de vulva pela mutação do p53.

Esses autores acreditam que a expressão do p53 encontrada nas doenças citadas é o p53 mutante.

Observamos uma diminuição na expressão do p53 após o tratamento com corticóide e acreditamos que o p53 expresso corresponde ao p53 mutante, por ser mais estável e melhor detectável imunistoquimicamente.

O grupo de doentes que utilizaram corticóide apresentou melhora dos sintomas clínicos e também uma diminuição significativa da expressão do p53.

Se o p53 que encontramos foi o mutante e esta diminuição ocorreu de fato, então sugere um efeito protetor da medicação nas doentes de líquen escleroso.

No entanto, o efeito protetor dos corticóides tópicos é controverso. Existem trabalhos de líquen escleroso vulvar que malignizaram sem nunca terem sido tratados com corticóides (VILMER et al., 1988), bem como relatos de casos que sofreram transformação maligna apesar da terapêutica com corticóide (CARLI et al., 1995; ROLFE et al., 2001).

Um estudo feito em 84 doentes com líquen escleroso vulvar avaliou os efeitos da aplicação do clobetasol durante 20 anos, sugerindo um efeito protetor desta medicação. As doentes de líquen escleroso que evoluíram para carcinoma de células escamosas foram mulheres não tratadas ou que fizeram uso irregular do corticóide (RENAUD-VILMER et al., 2004).

O mecanismo de ação dos corticóides tópicos não foi ainda totalmente elucidado. Sabe-se que há vários sistemas responsáveis pela explicação dos seus efeitos em nível molecular.

Uma forma de entender a sua ação esta relacionada à ligação a receptores específicos, seguido pelo início da transcrição de muitos genes alvo incluindo os responsáveis pelo fator de crescimento da epiderme e pelas proteínas do ciclo celular e por fim haveria a regulação da síntese de proteínas. Sabe-se que o uso de corticóide tópico diminui a síntese do RNA mensageiro e do colágeno (OIKARINEN et al., 1998).

A administração de dexametasona em hepatócitos de ratos resulta em um aumento rápido e seletivo na expressão da proteína p21, que atua na inibição do ciclo celular, sugerindo um papel na parada do ciclo celular (CHA et al., 1998). Entretanto, em fibroblastos há diminuição da proteína p21 em resposta a dexametasona (LI et al., 1998). Os corticóides podem estimular a apoptose em timócitos humanos *in vitro* (KIRSCH et al., 1999).

Rolfe et al. (2001) acreditam que o p53 e o Ki-67 são marcadores imunoistoquímicos de valor para avaliação das alterações que podem levar a malignização na vulva particularmente para a análise de área que devem ser reavaliadas com freqüência e/ou ser retiradas. Acreditamos no valor desses dois marcadores imunoistoquímicos para o acompanhamento de mulheres com líquen escleroso. Estudos por períodos prolongados com um número maior de doentes poderiam ser mais esclarecedores.

O comportamento da testosterona foi semelhante ao do clobetasol. Promoveu melhora da sintomatologia das doentes, e a expressão do Ki-67 e

p53 foi semelhante à do corticóide. Entretanto, os resultados encontrados foram mais atenuados. O mecanismo de ação da testosterona é diferente do corticóide, sendo que a melhora das doentes de líquen escleroso muitas vezes está relacionada ao efeito trófico positivo, levando ao espessamento cutâneo, secundário à vasodilatação e ao aumento da atividade da glândula sebácea e aumento na maturação dos fibroblastos em fibrócitos com conseqüente proliferação dérmica (SODO et al., 1990).

As duas medicações estudadas têm mecanismo de ação diferente, mas levaram a respostas semelhantes na melhora clínica e com relação aos marcadores imunoistoquímicos no líquen escleroso vulvar no período de três meses. Os resultados foram superiores nas doentes que utilizaram clobetasol. Entretanto, nenhuma droga ainda é definitiva no manejo da doença, e na prática clínica muitas vezes os corticóides são utilizados de forma sucessiva ou alternados com a testosterona na tentativa do controle da doença.

Vanin et al. (2002) avaliaram doentes com carcinoma de células escamosas da vulva e áreas adjacentes a tumores com líquen escleroso encontrando, pela primeira vez, valores iguais de mutações no cromossomo 17p, no qual está localizada a proteína p53, apesar de essas mutações ocorrerem em outro *locus*.

Novos estudos ainda precisam ser realizados para o completo entendimento do líquen escleroso vulvar. Novas pesquisas com o Ki-67 e p53 e outros marcadores poderiam levar a novas interpretações sobre o

comportamento da doença, o -que em última análise- melhoraria o tratamento e qualidade de vida das mulheres afetadas.

VII. CONCLUSÕES

1. As doentes com líquen escleroso vulvar tratadas com clobetasol e testosterona apresentaram melhora dos sintomas estatisticamente significativa ($p < 0,001$), comparadas às doentes que utilizaram um placebo, provando a eficácia desses tratamentos.

2. As doentes com líquen escleroso apresentam diminuição significativa das células marcadas com Ki-67 após tratamento tópico com clobetasol a 0,05% ($p < 0,01$) e testosterona a 2% ($p < 0,02$), enquanto as doentes que utilizaram um placebo apresentaram um aumento das células marcadas com Ki-67. Ao comparar a variação da expressão do Ki-67 (?%) entre os grupos, a diminuição do Ki-67 com o clobetasol e com a testosterona, e o aumento do Ki-67 no grupo placebo não teve significância estatística.

3. As doentes com líquen escleroso apresentam diminuição significativa das células marcadas com p53 após o tratamento tópico com clobetasol a 0,05% ($p < 0,01$) e testosterona a 2% ($p < 0,01$), enquanto as doentes que utilizaram um placebo apresentaram um aumento das células marcadas com p53. Ao comparar a variação da expressão do p53 (?%) entre os grupos, a diminuição do p53 no grupo clobetasol foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$), em relação a testosterona e placebo, que não diferiram entre si.