JOSÉ CARLOS SADALLA

**Expressão de claudinas e p53 em líquen escleroso e carcinoma
escamoso da vulva**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sadalla, José Carlos

Expressão de claudinas e p53 em líquen escleroso e carcinoma escamoso da vulva / José Carlos Sadalla.-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Jesus Paula Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias vulvares 2.Líquen escleroso vulvar 3.Junções intercelulares 4.Imunoistoquímica 5.Mutação

USP/FM/DBD-197/11

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Mariana** pelo carinho, dedicação e estímulo

À minha filha **Luísa** que ilumina meus dias

À minha mãe **Sônia** sempre presente e apoiadora

Ao meu pai **Elias** e irmãos **Elias**, **Armando** e **Júlia** pelo afeto contínuo

Aos meus avós **Armando** (*in memorian*) e **Zoraide** (*in memorian*) que moldaram meu caráter

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat**, pela oportunidade e confiança em poder realizar esta tese no Departamento de Ginecologia.

À Dra. **Lana Maria Aguiar**, pela colaboração na gênese deste projeto e contínuo incentivo.

Ao Prof. Dr. **Jesus Paula Carvalho**, pelo estímulo e dedicação para que este trabalho se concretizasse.

À Profa. Dra. **Sílvia Vanessa Lourenço**, pelos ensinamentos em Patologia e paciência na confecção e leitura conjunta das lâminas.

À Profa. Dra. **Mirian Nacagami Sotto**, pela colaboração e incentivo.

Ao Prof. Dr. **Jorge Saad Souen**, por despertar meu interesse em Oncologia, pelos ensinamentos cirúrgicos e a instrução no atendimento humanizado ao paciente oncológico.

Ao Prof. Dr. **Nilo Bozzini** pelo incentivo e amizade.

Enfim, a todos os **amigos** que, direta ou indiretamente, ajudaram a realizar este trabalho.

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	
	1.1 Câncer de vulva.....	1
	1.2 Líquen escleroso.....	6
	1.3 Oncogenes.....	14
	1.4 Junção intercelular.....	17
2	OBJETIVOS	
	2.1 Geral.....	22
	2.2 Específicos.....	22
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	
	3.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	23
	3.2 Características das pacientes.....	25
	3.3 Confeção do microarranjo de tecido (TMA).....	27
	3.4 Análise imunoistoquímica dos espécimens.....	28
	3.5 Método estatístico.....	33
4	RESULTADOS	
	4.1 Idade.....	34
	4.2 Estadiamento.....	34
	4.3 Expressão de claudinas e p53 nos grupos LE, ICEC e controle.....	34
	4.4 Expressão de claudinas e p53 nos grupos ICEC, LEACEC e ILE.....	36
	4.5 Expressão de claudinas e p53 no estadiamento do grupo ICEC.....	37
5	DISCUSSÃO	
	5.1 Idade e estadiamento.....	39
	5.2 Claudina-1.....	40
	5.3 Claudina-2.....	41
	5.4 Claudina-3.....	42
	5.5 Claudina-4.....	44
	5.6 Claudina-5.....	45
	5.7 Claudina-7.....	46
	5.8 Claudina-11.....	47
	5.9 p53.....	48
6	CONCLUSÕES.....	49
7	REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA	Técnica de análise de variância
CEC	Carcinoma espinocelular
CPE	Enterotoxina do <i>Clostridium perfringens</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HCV	Vírus da hepatite C
H/E	Hematoxilina-Eosina
HPV	Papiloma vírus humano
ICEC	Carcinoma escamoso de vulva isolado
IHQ	Imunoistoquímica
ILE	Líquen escleroso isolado
ISSVD	Sociedade Internacional para Estudo das Doenças Vulvovaginais
LE	Líquen escleroso
LEACEC	Líquen escleroso associado com carcinoma espinocelular
NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de cadeia em polimerase
TMA	Microarranjo de tecido
TJ	Junção intercelular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Idades das pacientes dos grupos LE, ICEC e controle..	25
Tabela 2	Idades das pacientes dos grupos LEACEC, ILE e ICEC	26
Tabela 3	Distribuição do estadiamento dos grupos ICEC e LEACEC.....	27
Tabela 4	Detalhes dos anticorpos anti-claudina, anti-p53 e das reações antigênicas.....	30
Tabela 5	Expressão de claudinas e p53 nos grupos LE, ICEC e controle.....	35
Tabela 6	Expressão de claudinas e p53 nos grupos ICEC, LEACEC e ILE.....	37
Tabela 7	Distribuição conjunta do estágio clínico e claudinas do grupo ICEC.....	38
Tabela 8	Distribuição conjunta do estágio clínico e p53 do grupo ICEC.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Expressão positiva de claudina-1 em paciente do grupo ICEC.....	31
Figura 2	Expressão positiva de claudina-2 em paciente do subgrupo ILE.....	31
Figura 3	Expressão positiva de claudina-3 em paciente do grupo ICEC.....	32
Figura 4	Expressão positiva de claudina-4 em paciente do subgrupo LEACEC.....	32
Figura 5	Expressão positiva de p53 (escore 2) em paciente do grupo ICEC.....	33

RESUMO

SADALLA,JC. *Líquen escleroso e câncer vulvar: avaliação de claudinas e p53* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 78p.

INTRODUÇÃO: O carcinoma escamoso (CEC) de vulva é um tumor ginecológico de baixa frequência, cuja incidência aumenta com o passar dos anos. Entre as vias patogênicas, destaca-se a neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) diferenciada, que está relacionada com o líquen escleroso (LE). A maioria dos estudos publicados comparou o CEC vulvar com LE no âmbito morfológico apenas. Poucos avaliaram estas afecções em relação à biologia molecular, e nenhum avaliou o papel da junção intercelular (TJ). Nosso objetivo foi analisar a expressão de claudinas (proteínas atuantes na TJ) e do p53 nestas doenças. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** avaliamos o produto do oncogene TP53 e a expressão das claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 11 em amostras de tecido vulvar humano de três grupos de pacientes: LE, CEC isolado (ICEC) e grupo controle. **RESULTADOS:** As claudinas 1, 2, 3 e 4 foram expressas igualmente nos três grupos. As claudinas 5, 7 e 11 não foram expressas nos grupos LE e ICEC, estando presentes apenas no grupo controle. Esta diferença foi significativa apenas para as claudinas 7 ($p=0,013$) e 11 ($p=0,001$). A proteína p53 foi mais expressa no grupo ICEC, seguida pelo LE e pelo grupo controle ($p=0,017$). **CONCLUSÕES:** As claudinas 5, 7 e 11 não se expressaram nos casos de LE e/ou ICEC. As claudinas 7 e 11 foram expressas apenas no grupo controle. Houve perda da expressão das claudinas 7 e 11 nos grupos com doença (LE e ICEC), em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na expressão de claudinas entre os grupos LE e ICEC. Observou-se presença de p53 nos grupos estudados, cuja distribuição variou conforme o grupo analisado. Esta expressão foi maior no grupo ICEC, seguido pelo LE e, menor, no grupo controle.

Descritores: neoplasias vulvares, líquen escleroso vulvar, junções intercelulares, imunoistoquímica, mutação

SUMMARY

SADALLA,JC. *Claudins and p53 expression in vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 78p.

AIMS: Vulvar squamous cell carcinoma (SCC) is a rare gynaecologic cancer. Vulvar SCC has been shown to develop from vulvar intraepithelial neoplasias (VINs), which are related to lichen sclerosus (LS). Most studies to date have compared vulvar SCC to LS only morphologically, but no detailed molecular analysis has been performed. Our objective was to compare claudin and p53 expression in these diseases and determine if there was an association with expression and vulvar SCC progression. **METHODS:** Immunohistochemical analysis was performed in order to determine expression of p53 and claudin 1, 2, 3, 4, 5, 7, and 11 in human vulvar tissue samples from LS, SCC, and control patients. **RESULTS:** Claudin 1, 2, 3, 4, and 5 were expressed comparably in the three groups. Claudin 7 and 11 expression was significantly decreased in LS and SCC samples ($p=0,013$ and $0,001$, respectively) compared with the control group. Expression of p53 was significantly increased in SCC and LS patient samples compared with the control group ($p=0,017$). **CONCLUSIONS:** Claudins 7 and 11 were expressed only in control group. There was loss of expression of claudins 7 and 11 in the disease groups (LS and/or SCC), comparing to control group. However, there was no significant difference in expression of any of the claudins between the LS and SCC samples. Furthermore, p53 expression is higher in SCC patients and lower in control group. However, expression of p53 did not vary between samples from isolated LS (ILS) and LS associated with SCC (ALSSCC) patients.

Key words: vulvar neoplasms, vulvar lichen sclerosus, tight junctions, p53, immunohistochemistry, mutation

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Câncer de vulva

O câncer de vulva é um tumor ginecológico de baixa frequência, representando aproximadamente 3-5% dos tumores genitais e 1% dos cânceres na mulher, com uma incidência crescendo de 1-2/100000 aos 50 anos para 20/100000 aos 80 anos (FIGO, 2003; Hullu, 2006; Fons, 2007).¹⁻³ Na Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, particularmente, este câncer apresenta uma baixa frequência, sendo menor que as neoplasias de colo uterino, endométrio e ovário (Souen, 2001).⁴ Apesar de rara, esta neoplasia vem aumentando de frequência: na Inglaterra aumentou 17% entre 1979 e 2001 e nos Estados Unidos da América (EUA) cresceu 2,4% ao ano entre 1992 e 1998 (Howe, 2001; MacLean, 2004; MacLean, 2006).⁵⁻⁷ Parte deste aumento ocorreu em mulheres acima de 75 anos (esta faixa etária compreende mais de 50% dos casos e o tratamento destas pacientes fica comprometido pelas comorbidades existentes), sendo reflexo da maior longevidade (Makar, 2001).⁸ Neste intervalo de tempo mais que dobraram os casos de câncer de vulva entre 1979 e 1999 (MacLean, 2004).⁶

No Brasil, particularmente, há uma maior incidência de carcinoma vulvar, com incidência de 2,1/100000 habitantes em Goiânia, 3,1/100000 em Porto Alegre e 4,2/100000 em São Paulo (Pinto, 1999).⁹

Por causa da pequena experiência individual das instituições no manuseio desta neoplasia, estudos randomizados com abordagens terapêuticas são incomuns e a maioria dos estudos é baseada em revisões retrospectivas clínico-patológicas (FIGO, 2003).¹ Este tipo de câncer predomina em mulheres na pós-menopausa, aumentando sua incidência com o passar dos anos. Apesar da vulva ser um órgão externo, geralmente há um atraso na detecção da doença, não sendo incomum nos depararmos com tumores avançados por ocasião do diagnóstico.

Noventa por cento dos casos são de carcinoma escamoso (ou, como sinônimos, espinocelular ou epidermóide), porém outros tipos histológicos, como melanomas e adenocarcinomas também se fazem presentes (MacLean, 2006).⁷ A maioria dos carcinomas escamosos ocorre nos grandes lábios. No entanto, também incidem nos pequenos lábios, clitóris e região perineal. O sintoma mais comum é o prurido vulvar localizado (FIGO, 2003; Hullu, 2006).^{1,2} Outros achados são massa vulvar, sangramento, dor, corrimento ou sintomas do trato urinário (Hullu, 2006).² Como fatores de risco em pacientes jovens, abaixo de 45 anos, citamos a relação com papiloma vírus humano (HPV), presença de neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) e tabagismo (Lanneau, 2009).¹⁰

O tratamento deste tumor varia de acordo com cada estágio da doença. Tumores precoces são considerados aqueles confinados à vulva, sem acometimento clínico linfonodal. Nesta eventualidade, caso o tumor tenha mais que 2cm, preconiza-se excisão local radical com linfadenectomia inguinfemoral bilateral (FIGO, 2003).¹ A excisão local radical é uma operação mais conservadora que a vulvectomy radical, com menor morbidade física e psicológica, tendo o mesmo índice de recorrência local (FIGO, 2003).¹ Já nos cânceres menores que 2cm, com invasão menor que 1mm, pratica-se apenas a excisão local radical, não havendo necessidade de linfadenectomia (FIGO, 2003).¹ Se o diâmetro tumoral for maior que 2cm, deve-se incluir a linfadenectomia inguinfemoral (FIGO, 2003).¹ Outro fator que influi na terapêutica é a localização do tumor. Sendo assim, se o câncer estiver a menos de 1cm da linha média, ou seja, residindo em pequeno lábio, clitóris ou fúrcula, deve-se fazer a linfadenectomia bilateral (FIGO, 2003).¹ Isto também se aplica caso haja linfonodos positivos ipsilaterais à lesão. Com relação aos tumores avançados, ou seja, com acometimento linfonodal, ou uretral/anal com necessidade de estomias, uma alternativa à cirurgia é a quimiorradiação neoadjuvante. Esta abordagem tem a finalidade de reduzir o tamanho da lesão, possibilitando uma cirurgia menos ampla e complexa (FIGO, 2003).¹ Porém, em todos estes casos, as seqüelas terapêuticas são profundas, principalmente no campo estético, psicológico e sexual.

O prognóstico deste tumor relaciona-se com vários parâmetros, como idade, tamanho tumoral, profundidade de invasão, comprometimento

linfonodal, invasão vascular e/ou linfática peritumoral, e características tumorais como grau histológico e ploidia (Lerma, 1999; Pinto, 2004; Raspagliesi, 2006; Fons, 2007).^{3,11-13} Dentre estes fatores, o de pior prognóstico é a presença de linfonodos acometidos pelo tumor (Raspagliesi, 2006).¹³ Estes mesmos resultados já haviam sido observados num estudo brasileiro, de Pinto e colaboradores, em 2004, mostrando pior prognóstico à medida que havia maior número de linfonodos positivos e/ou presença de crescimento tumoral extracapsular linfonodal. Também evidenciaram a ausência de relação com prognóstico a presença de ácido desoxirribonucléico (DNA) de HPV no carcinoma vulvar.¹² Com relação à presença de DNA de HPV, outros estudos, entretanto, mostraram que sua ausência (tumores “HPV negativos”) estava relacionada a um pior prognóstico (Monk, 1995; Growdon, 2008).^{14,15}

Em relação à histopatologia, o tipo histológico escamoso (CEC) vulvar corresponde a um grupo heterogêneo do ponto de vista etiopatogênico e é precedido por lesões precursoras, cuja classificação vem sendo revista em função da via carcinogénica a que pertencem. Estas lesões precursoras foram denominadas “neoplasias intraepiteliais vulvares” (NIVs) e tradicionalmente classificadas em três categorias quanto ao distúrbio de graduação (Organização Mundial da Saúde - OMS). Neste escalonamento de 1 a 3, feito segundo modelo do colo uterino, incluíam-se pelo menos dois grupos de lesões: baixo (NIV 1) e alto grau (NIV 2 e 3). Entretanto, na vulva, ao contrário do colo uterino, as NIVs 1 provaram ser lesões de débil reprodutibilidade histológica (Preti, 2000)¹⁶ e questionável poder de evolução

para o câncer (Scurry, 2006).¹⁷ Por outro lado, as NIVs de alto grau, graduadas 2 ou 3, têm poder evolutivo, portanto podem ser consideradas lesões precursoras de fato (Jones, 2005; Scurry, 2006).^{17,18} Com a constatação de pelo menos duas vias patogênicas implicadas com o carcinoma escamoso da vulva, uma envolvida com o HPV e outra com o líquen escleroso, puderam ser delineados dois padrões histológicos de lesão precursora (van der Avoort, 2006).¹⁹ Estas lesões precursoras são atualmente classificadas em dois tipos: a) usual, mais freqüente e relacionado ao HPV, e b) diferenciado, associado aos carcinomas escamosos de mulheres mais idosas, não relacionados aos vírus (Sideri, 2005; Scurry, 2006).^{20,21} A sistematização da classificação das lesões precursoras vulvares foi feita pela Sociedade Internacional para Estudo das Doenças Vulvovaginais (ISSVD – International Society for the Study of Vulvovaginal Disease) (Sideri, 2005).²⁰ Na atual classificação somente as NIVs de alto grau são consideradas lesões precursoras e são subdivididas nas formas usual e diferenciada; sendo as primeiras com padrões morfológicos basalóide e condilomatoso, ambos relacionados à etiologia viral (Sideri, 2005; Scurry, 2006).^{17,20} Já a NIV diferenciada é vista particularmente em mulheres idosas com líquen escleroso e/ou hiperplasia de células escamosas, associados ao CEC em pacientes nesta faixa etária (Carlson, 1998; Pinto, 1999; Sideri, 2005; MacLean, 2006; Scurry, 2006).^{7,9,17,20,22}

1.2- Líquen Escleroso

Líquen escleroso (LE) é uma doença inflamatória crônica da pele e mucosa. Pode acometer qualquer superfície cutânea, porém tem predileção pela região anogenital (Meffert, 1995; Rolfe, 2003; Pugliese, 2007).³⁵⁻³⁷ Esta doença foi descrita clinicamente pela primeira vez por Hallopeau em 1887, sendo nomeada de líquen plano atrófico. Em 1892, Darier descreveu os padrões histológicos desta doença, nomeando-a líquen plano escleroso. Entretanto, como nem todos os casos possuem atrofia à histologia, Friedrich, em 1976, propôs a remoção do termo “atrófico”. Sendo assim, a ISSVD, em 1976, oficialmente adotou o termo líquen escleroso para definição desta afecção (Powell, 1999; Val, 2005).^{38,39}

LE é identificado em pacientes de todas as idades, inclusive na infância. Sua exata prevalência é difícil de estimar porque vários especialistas podem se defrontar com esta afecção, como pediatras, dermatologistas, ginecologistas e urologistas (Yesudian, 2005).⁴⁰ Entretanto, em 1971, Wallace estimou a prevalência de LE variando de 1:300 a 1:1000 de pacientes referenciados a um centro comunitário de atendimento dermatológico (Wallace, 1971).³¹

LE é mais freqüente em caucasianas, sendo incomum em outras etnias (Dogliotti, 1974; Wang, 1991; Powell, 1999; Yesudian, 2005).^{38,40-42} É mais prevalente em mulheres do que homens, com proporção variando de 6:1 a 10:1. A maioria dos casos em mulheres ocorre na pós-menopausa, sendo a idade média na 5ª. para 6ª. décadas de vida (Carlson, 1998; Neill,

2002).^{22,43} Apenas 7-15% dos casos acometem mulheres pré-púberes (Powell, 1999).³⁸

LE pode ter um curso clínico insidioso ou agressivo, ficando algumas pacientes assintomáticas por longos períodos. Geralmente afeta a região anogenital (85-98% dos casos). Já o envolvimento extragenital é mais incomum, incidindo em 15-20% das pacientes. O diagnóstico diferencial engloba líquen plano, vitiligo, psoríase e NIV (Val, 2005).³⁹ Os sintomas mais frequentes são prurido intratável e inflamação das regiões vulvar e perianal. Outras queixas são disúria, dispareunia e dor à defecação (Yesudian, 2005).⁴⁰ Ao exame físico as alterações da pele adquirem o formato do número oito, com pedaços ou placas de pele fina, atrófica e frágil ao redor da vulva e ânus. Com o passar do tempo, fissuras e cortes se desenvolvem e, através da cicatrização, podem levar à fusão dos pequenos lábios e encurtamento do intróito. Tudo isso conduz ao encobrimento do clitóris. Sinais de LE em meninas podem se confundir com abuso sexual. Entretanto, vale lembrar que alguns autores acreditam que o abuso sexual “per se” possa ser o gatilho que inicia LE, já que a cicatrização e o trauma podem induzir lesões de pele típicas desta doença. Por fim, os sintomas e sinais de LE podem melhorar espontaneamente na menarca, sendo o papel hormonal questionado por alguns autores (Powell, 1999; Val, 2005).^{38,39}

Lesões extragenitais são incomuns. Entretanto, quando ocorrem, geralmente afetam a parte interna das coxas, região submamária, pescoço, ombros e punhos. Locais acometidos mais raros, porém já descritos,

incluem a mucosa oral (boca, palato e lábios) e leito ungueal (Ramrakha-Jones, 2001; Jensen, 2002; Pugliese, 2007).^{37,44,45}

Apesar da etiologia ser incerta, predisposição genética, infecções, fatores autoimunes, hormonais e locais são implicados na sua patogênese (Powell, 1999; Yesudian, 2005; Pugliese, 2007).^{37,38,40}

A desregulação imune é uma das mais aceitas teorias sobre a gênese de LE (Regauer, 2005).⁴⁶ Autoanticorpos foram encontrados em pacientes com LE, além de uma maior incidência de doenças autoimunes, como diabetes, vitiligo e alopecia. Em um estudo com 350 mulheres com LE, 22% tinham doença autoimune, 42% tinham autoanticorpos, e 60% tinham um ou mais distúrbios autoimunes, particularmente alopecia areata (9%), vitiligo (6%) e tireoidopatia (6%) (Meyrick-Thomas, 1988).³⁴

Vários agentes infecciosos foram relacionados ao LE, como bacilos e espiroquetas (Powell, 1999).³⁸ Acrodermatite crônica atrófica, causada por *Borrelia burgdorferi*, apresenta aspectos clínicos e histológicos semelhantes ao LE. Contudo, sorologia e reação de cadeia em polimerase (PCR) não comprovaram esta associação (Weide, 2000).⁴⁷ Agentes virais também foram investigados. Uma alta frequência de papiloma vírus humano (HPV) foi detectada por PCR em lesões de pacientes pediátricos com LE. Além disso, crianças com LE tinham mais casos de displasia associada ao HPV do que crianças sem esta doença (Drut, 1998; Beattie, 2006).^{48,49} Entretanto, num trabalho com dez casos de carcinoma espinocelular de vulva, não houve associação com HPV (Neill, 1990).⁵⁰ Também contra uma associação viral, foi encontrado LE em cicatrizes de herpes zoster, mas sem correlação

com persistência do DNA viral do varicela-zoster vírus nas lesões (Requena, 1998).⁵¹ Não obstante, uma associação de hepatite C e LE foi postulada, havendo casos descritos na literatura de LE em pacientes com HCV (vírus da hepatite C) (Yashar, 2004; Val, 2005).^{39,52}

LE é mais freqüentemente observado em mulheres pré-púberes e na pós-menopausa, sugerindo uma relação com hipoestrogenismo (Meyrick-Thomas, 1988).³⁴ Embora seja uma hipótese plausível, não houve associação do LE com gravidez, uso de contraceptivo hormonal oral e terapia hormonal (Yesudian, 2005).⁴⁰ Tudo isto pode explicar a ausência de eficácia do tratamento tópico estrogênico para esta doença (Skierlo, 1987; Kohlberger, 1998).^{53,54} Mais ainda, Kohlberger e colaboradores, em 1998, estudaram material em parafina de 39 biópsias de LE, pesquisando a presença de receptores hormonais por método de imunoistoquímica. Foram encontrados cinco casos positivos para receptor androgênico, um para receptor estrogênico e nenhum para receptor de progesterona.⁵⁴ Neste trabalho, apesar da casuística pequena, dos cinco casos com receptor androgênico positivo, quatro (80%) eram assintomáticos, sendo levantada a hipótese pelo autor que o quadro clínico dependeria do status do receptor hormonal (Kohlberger, 1998).⁵⁴

Koebner descreveu a ocorrência de lesões de psoríase em regiões de injúria de pele, indicando que o trauma local fosse uma possível causa de doença (Miller, 1982).⁵⁵ Este processo, chamado de fenômeno de Koebner, é sugerido como uma possível etiologia do LE (Pock, 1990).⁵⁶ Enquanto a circuncisão não esteja relacionada com LE, esta doença já foi relatada em

cicatrizes desta cirurgia (Powell, 1999, Val, 2005).^{38,39} Mais ainda, relatam-se início de lesões de LE depois de queimadura solar, radioterapia e vulvectomy (Pass, 1984; Yates, 1985; Milligan, 1988).⁵⁷⁻⁵⁹

O risco médio de CEC vulvar é de 3-6% em mulheres com LE (Val, 2005).³⁹ Além disso, nos casos de CEC vulvar, encontram-se até 60% de LE em áreas adjacentes ao tumor (Hart, 1975; Leibowitch, 1990; Carlson, 1998; Scurry, 2001; Chiesa-Vottero, 2006; Roberto Netto, 2006).^{22,32,60-63} A análise de mulheres com LE vulvar mostrou desregulação celular imune sistêmica que, teoricamente, propicia um ambiente favorável ao desenvolvimento de CEC (Regauer, 2005).⁴⁶ Entretanto, LE extragenital não parece ter um risco aumentado de transformação maligna (Pugliese, 2007).³⁷

Os padrões histológicos incluem hiperqueratose do epitélio, degeneração hidrópica de células basais, esclerose do colágeno subepitelial, infiltrado linfocítico dérmico, atrofia da epiderme com perda das pregueações e homogeneização do colágeno no terço superior da derme. Isto se traduz com adelgaçamento do epitélio, edema subepitelial com depósito de fibrina e zona adjacente de infiltração crônica na derme (Kurman, 2002; Martins, 2005).^{64,65} Pequenas artérias e arteríolas da parte superior e média da derme podem apresentar endarterite obliterante. Estas mudanças no epitélio, especialmente a hiperqueratose, aliadas às mudanças no colágeno, geram o aspecto branco brilhante, característico desta doença (Val, 2005).³⁹

As lesões de LE podem se cronificar e progredir ou assumir um curso clínico com períodos de remissão. Apesar de caráter recorrente, alguns

casos de regressão espontânea são descritos. Entretanto, ressalta-se o detrimento na qualidade de vida oriundo do estresse e ansiedade de uma doença de comportamento incerto (Powell, 1999; Val, 2005).^{38,39} Este fato, associado com a formação de cicatrizes geradas pelas lesões de LE, resultam em morbidade significativa (Carlson, 1998; Yesudian, 2005; Roberto Netto, 2006).^{22,40,63}

Os objetivos do tratamento do LE consistem no alívio dos sintomas e do desconforto, prevenção de mudanças anatômicas como estreitamento vulvar, e prevenção da transformação maligna. A biópsia inicial da lesão antes de tratamento clínico e/ou cirúrgico é mandatária para confirmar o diagnóstico de LE e excluir CEC. Há controvérsia se todos os pacientes devem ser tratados, mesmo aqueles assintomáticos. Particularmente neste grupo, acredita-se que o tratamento previne a progressão da doença e possivelmente evita a transformação maligna (Powell, 1999; Val, 2005; Pugliese, 2007).³⁷⁻³⁹

O tratamento do LE varia desde o uso de medicações tópicas e sistêmicas até procedimentos não invasivos e cirurgia (Pugliese, 2007).³⁷

A abordagem tradicional consiste no uso tópico de esteróides, que potencialmente inibem o processo inflamatório crônico. Com isso, são úteis no tratamento inicial do LE, diminuindo os sintomas e retardando a progressão da doença. Seu uso também demonstrou reverter algumas alterações histológicas do LE (Bracco, 1993; Powell, 1999).^{38,66} Não há recomendação universal com relação ao tipo de esteróide a ser utilizado, nem quanto à duração do tratamento (Val, 2005).³⁹ O propionato de

clobetasol (0,05%) é o mais utilizado, sendo aplicado uma vez por dia, por 2-3 meses, com redução progressiva da dosagem (Powell, 1999; Val, 2005).^{38,39} Efeitos colaterais deste tratamento incluem atrofia cutânea, supressão adrenal, hipopigmentação, e reações de sensibilidade ao contato (como queimação, coceira, secura, maceração e flacidez) (Powell, 1999; Val, 2005).^{38,39} Esteróides potentes devem ser evitados na população pediátrica, e recomenda-se aos pacientes a lavagem vigorosa das mãos após seu uso com a finalidade de evitar espalhar a medicação para outras áreas sensíveis (como os olhos), além de evitar a exposição ao parceiro (Powell, 1999; Val, 2005; Pugliese, 2007).^{37,38,39} Ao término do tratamento, a doença pode reaparecer (Pugliese, 2007).³⁷

Outra modalidade de tratamento é a terapia hormonal. Melhora dos sintomas, das lesões clínicas e mesmo das alterações histopatológicas foram relatadas após uso de propionato de testosterona no LE (Friedrich Jr, 1971).⁶⁷ Já em outros estudos, o propionato de testosterona não foi superior ao placebo (Sideri, 1994).⁶⁸ Num estudo comparativo de LE, progesterona tópica foi inferior à testosterona e ao clobetasol (Bracco, 1993).⁶⁶ Já na comparação entre progesterona e testosterona frente aos corticosteróides, estes últimos apresentaram resultados superiores (Powell, 1999).³⁸

Ainda como tratamento clínico, citamos as drogas sistêmicas. Estas também são usadas no LE, porém são reservadas para os casos mais severos, não responsivos ou intolerantes ao tratamento tópico com corticosteróides (Powell, 1999; Val, 2005).^{38,39} Retinóides, como acitretina, são efetivos. Entretanto, possuem vários efeitos colaterais (Bousema, 1994;

Basak, 2002).^{69,70} Há relatos também de tratamento com estanozolol, cloroquina, para-aminobenzoato de potássio e calcitriol no controle do LE vulvar e extragenital (Penneys, 1984; Wakelin, 1994; Parsad, 1998; Ronger, 2003).⁷¹⁻⁷⁴

Mais ainda, como procedimentos não cirúrgicos temos também a crioterapia, fototerapia ultravioleta, laser de dióxido de carbono, e injeção subcutânea com álcool absoluto (Powell, 1999; Kastner, 2003; Beattie, 2006).^{38,49,75} Num estudo com nove meninas e 22 mulheres com LE vulvar, crioterapia tem alguma eficácia clínica com mínimos efeitos colaterais (Kastner, 2003).⁷⁵ Em outro estudo com sete mulheres com LE genital severo, não responsivo aos esteróides tópicos potentes, foi realizado fototerapia ultravioleta. Três tiveram resposta moderada, duas tiveram mínima resposta e duas não tiveram melhora. Das cinco que tiveram melhora, uma recidivou em três meses e outra após um ano. As demais se mantiveram em controle com esteróides tópicos intermitentes (Beattie, 2006).⁴⁹ Vaporização à laser com ondas contínuas de dióxido de carbono também foi utilizado com sucesso no LE (Rosemberg, 1982).⁷⁶ Entretanto, mais pesquisas são necessárias nestas modalidades alternativas de tratamento.

Tratamento cirúrgico pode ser necessário nos casos de progressão de doença em pacientes em uso de terapia clínica. São realizados procedimentos como dissecação do clitóris encoberto, divisão dos lábios fundidos e/ou alargamento do intróito estreitado (Rouzier, 2002).⁷⁷

Vulvectomy no LE, na ausência de malignidade, não é mais utilizada (Powell, 1999).³⁸

Finalizando, como uma das vias carcinogénicas para o câncer da vulva envolve a neoplasia intraepitelial de tipo diferenciado, relacionada ao líquen escleroso, buscou-se relacionar esta doença com CEC vulvar (van Seters, 2007).²³ Também se constatou que a maioria dos casos de CEC vulvar em idosas apresentam líquen escleroso, hiperplasia de células escamosas ou NIV diferenciada na epiderme adjacente ao tumor (MacLean, 2006)⁷. Mais ainda, vários relatos de casos corroboraram esta associação (August, 1980; Eng, 1980; di Paola, 1983; Cario, 1984; Lindeque, 1987; Roman, 1991; Carlson, 1998).^{22,24-29} Estes relatos se basearam fundamentalmente no acompanhamento de pacientes com LE, que acabaram desenvolvendo CEC vulvar. Seguimento de casuísticas grandes de casos de LE (uma delas compilando 5207 casos publicados) mostraram uma incidência entre 3 e 5,4% de CEC, que é bem maior que a incidência deste tumor na população em geral (Jeffcoate, 1961; Wallace, 1971; Hart, 1975; Friedrich, 1985; Meyrick-Thomas, 1988; Meffert, 1995).³⁰⁻³⁵

1.3 – Oncogenes

Os genes supressores tumorais impedem o surgimento de tumores. Destes, o mais estudado é o TP53, também conhecido como “guardião do genoma”. Localiza-se no cromossomo 17, no locus 17p13.1, sendo

composto por 11 éxons com 10 íntrons (Rolfe, 2003).³⁶ Ele participa do mecanismo de apoptose, impedindo a proliferação celular desordenada. Esta ação é decorrente da parada do ciclo celular em G1 até que haja mecanismo de reparo ao dano celular. Caso isto não ocorra, há indução da apoptose (Kuribayashi, 2008).⁷⁸ Mutações somáticas inativadoras e ruptura da proteína p53 são descritos em praticamente todos os tumores malignos, não só da esfera ginecológica (Corney, 2008; Lahat, 2008; Tomkova, 2008).⁷⁹⁻⁸¹ Sua inativação por mutação logo ao nascimento leva à síndrome de Li-Fraumeni, uma rara condição predispondo á várias neoplasias. Esta síndrome é caracterizada por início precoce de diferentes tipos de tumores, como sarcomas de partes moles, leucemias, cânceres de mama, cérebro, pulmão, laringe e adrenal (Tomkova, 2008).⁸¹

A proteína que é transcrita e depois traduzida deste gene possui curta meia-vida e, apesar de presente no tecido normal, geralmente não é demonstrada por técnicas de imunoistoquímica (IHQ). Entretanto, quando ocorre mutação no gene TP53, há um aumento de sua meia-vida, possibilitando sua detecção. A análise da proteína p53 é usualmente através do anticorpo monoclonal p53, pesquisado através de IHQ do material pesquisado. Vale ressaltar, porém, que detecção por IHQ não significa necessariamente mutação, pois estabilização de outras proteínas (como mdm2) também resulta em superexpressão de p53 (Carlson, 1998; Rolfe, 2001; MacLean, 2006).^{7,22,82}

Observou-se, inclusive, a superexpressão da proteína p53 não só em cânceres, como o carcinoma vulvar, mas também em doenças benignas,

como o líquen escleroso (Carlson, 1998; Rolfe, 2001; Liegl, 2004; Liegl, 2006).^{22,82-84} Porém, questiona-se se isto é relacionado à tumorigênese ou ao mecanismo de reparo celular frente à injúria (Bosari, 1993; Carlson, 1998; Rolfe, 2001).^{22,82,85} Rolfe e colegas (2001) analisaram a superexpressão da proteína p53 em uma paciente com diagnóstico de LE vulvar com 35 anos de idade, submetida à vulvectomy radical por carcinoma 11 anos depois. Esta paciente teve várias recorrências do carcinoma e pelos oito anos seguintes foram realizadas 33 biópsias de lesões clínicas suspeitas. Os espécimes revelaram uma gama de lesões, incluindo LE, hiperplasia escamosa, NIV diferenciada e câncer. IHQ para p53 nestas biópsias mostrou que praticamente todas as lesões de carcinoma tinham altos níveis de p53. Além disso, biópsias das mesmas áreas diagnosticadas posteriormente com carcinoma já mostravam superexpressão de p53 até quatro anos antes do diagnóstico de câncer. Estes achados nos encorajam a acreditar que mutações no p53 ou sua superexpressão precedem o desenvolvimento de câncer. Mais ainda, identificação destas mudanças em áreas de LE pode permitir aplicação tópica de esteróides ou mesmo excisão cirúrgica com a finalidade de prevenir a progressão ao câncer (Rolfe,2001).

1.4 – Junção Intercelular

A permeabilidade paracelular entre as células epiteliais é regulada pelas junções intercelulares (“tight junctions” - TJs), que são as junções adjacentes ao final apical da superfície de membrana lateral destas células (Sawada, 2003; Utech, 2006).^{86,87} As TJs possuem duas funções, a de barreira e a de cerca. A função de barreira regula a passagem de íons, água, e várias macromoléculas, até células cancerosas, através dos espaços paracelulares (Sawada, 2003; Koval, 2006).^{86,88} Desta forma, esta função de barreira é relevante nos quadros de edema, vômitos, diarreia e metástases (Sawada, 2003).⁸⁶ Por outro lado, a função de cerca mantém a polaridade celular. Em outras palavras, isto previne a interação entre moléculas da membrana apical com as da membrana lateral. Este mecanismo está intimamente envolvido na biologia da célula cancerígena, principalmente na perda de polaridade celular (Sawada, 2003; Saeki, 2009).^{86,89} Assim, constata-se nas células tumorais malignas função anormal das TJs, seguida da perda da polaridade celular e do contato intercelular, que ocorre geralmente nos tumores avançados e nos estágios iniciais da carcinogênese (Wodarz, 2007).⁹⁰

As claudinas, proteínas transmembrana de 23 kDa com quatro domínios, atuam no funcionamento das TJs. Esta atuação ocorre tanto no mecanismo de barreira, regulando o transporte paracelular, como na polaridade celular. Estas proteínas são tão importantes, que se acredita que as propriedades de cada TJ estejam relacionadas às propriedades das

claudinas expressas na mesma (Itallie, 2004; Balkovetz, 2006).^{91,92} Ainda em relação ao transporte paracelular, as claudinas ocasionam uma descarga iônica seletiva. Como exemplo disto, temos que a expressão de claudina-4 está relacionada a um decréscimo da permeabilidade ao íon sódio (Na^+), não alterando a mesma em relação ao cloreto (Cl^-). Isto influi também no balanço iônico e na polaridade celular (Itallie, 2004).⁹¹ Há 24 membros descritos nesta família de proteínas, diferindo sua expressão e ação no mecanismo de barreira de acordo com cada tipo (Kondoh, 2006).⁹³

Particularmente, as claudinas 3 e 4 são freqüentemente superexpressas em várias neoplasias, incluindo estômago, ovário, mama, pâncreas, próstata e corpo uterino (Morin, 2005; Swisshelm, 2005; Hewitt, 2006; Santin e Marizzoni, 2007; Santin e Siegel, 2007; Kulka, 2008; Saeki, 2009).^{89,94-99} Já as claudinas 1 e 7 possuem associação com o câncer de colo uterino (Lee, 2005; Sobel, 2005).^{100,101} A claudina-7 teve pouca expressão nos cânceres de mama e de cabeça e pescoço, porém esteve superexpressa no câncer de estômago (Hewitt, 2006).⁹⁶ Investigou-se ainda a relação das claudinas 1, 3, 4, 5 e 11 nos tumores de ovário benignos, borderline e malignos. Observou-se superexpressão da claudina-11 nos tumores borderline e superexpressão das claudinas 3 e 4 nos tumores malignos (Aravindakshan, 2006; Zhu, 2006).^{102,103} Por fim, estas proteínas, principalmente as claudinas 1, 2, 3, 4, 5 e 7, são marcadores de diferenciação epitelial, ajudando distinguir neoplasias epiteliais de linfomas (Soini, 2005).¹⁰⁴

O padrão de superexpressão das claudinas nas células do câncer, que geralmente perdem as TJs, é inesperado. Porém, a atuação destas proteínas não necessariamente está restrita à formação das TJs. De fato, estudos recentes mostram o envolvimento das claudinas na sobrevivência e na capacidade de invasão das células cancerígenas (Kominsky, 2003; Michl, 2003; Agarwal, 2005).¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Independente da função exata das claudinas nas células neoplásicas, a expressão destas proteínas pode ter significado clínico relevante. Por exemplo, a expressão da claudina-1 mostrou ser de valor prognóstico no câncer de cólon e esôfago (Resnick, 2005; Miyamoto, 2008).^{108,109} Ainda com relação a estes cânceres, uma menor expressão de claudina-7 foi relacionada com invasão vascular, metástase hepática (câncer de cólon) e disseminação linfonodal (câncer de esôfago) (Usami, 2006; Oshima, 2008).^{110,111} Já com o carcinoma de esôfago, uma menor expressão das claudinas 3 e 4 foi associada com presença de metástases (Takala, 2007).¹¹² Ainda na esfera gastrointestinal, a claudina-18 apresentou correlação prognóstica com carcinoma gástrico (Sanada, 2006)¹¹³; e a claudina-10 com o carcinoma hepatocelular (Cheung, 2005).¹¹⁴

Com relação à ginecologia, a expressão das claudinas 3 e 7 mostrou uma correlação negativa com sobrevida (claudina-3) e menor intervalo livre de doença (claudina-7) no carcinoma de ovário (Choi, 2007; Kleinberg, 2008).^{115,116} Pan e colaboradores, em 2007, mostraram que uma maior expressão de claudinas 3 e 4 estava relacionada a um maior grau de invasão miometrial no carcinoma endometrial.¹¹⁷ No carcinoma de mama,

uma menor expressão de claudina-1 foi relacionada à maior recorrência (Morohashi, 2007).¹¹⁸ Isto também foi verificado com a claudina-7, além de um maior grau tumoral dos carcinomas mamários e maior incidência de metástases (Kominsky, 2003; Sauer, 2005).^{119,120} Ainda com relação ao câncer mamário, Kim e colaboradores, em 2008, demonstraram que uma menor expressão de claudina-2 estava associada com doença mais avançada.¹²¹ O mesmo foi demonstrado por Martin e colaboradores, em 2008, com a claudina-16.¹²²

Além disso, por serem proteínas presentes na superfície celular, podem ter utilidade como alvos para várias estratégias terapêuticas. Nesta vertente, temos o possível uso da enterotoxina do *Clostridium perfringens* (CPE) como um ligante natural para as claudinas 3 e 4. A ligação desta toxina com as claudinas leva a uma rápida citólise das células (Katahira, 1997).¹²³ Estudos clínicos mais recentes sugerem que o uso da CPE possa ser efetivo contra neoplasias que superexpressam claudinas 3 e 4 (Long, 2001; Michl, 2001; Kominsky, 2004; Santin, 2005; Santin e Marizzoni, 2007; Santin e Siegel, 2007; Saeki, 2009).^{89,97,98,124-127}

Infelizmente, o padrão exato de expressão das diversas claudinas nos diferentes tipos de câncer e nos tecidos normais ainda é desconhecido. Até o presente momento, apenas algumas proteínas dessa família foram investigadas, somente em pequena gama de casos de câncer em geral. Corroborando esses dados, também não há nenhum estudo na literatura até o momento relacionando as claudinas e o câncer de vulva.

Na literatura não há também até a presente data qualquer estudo avaliando o papel das claudinas no líquen escleroso e no carcinoma escamoso da vulva.

Considerando a soma de evidências que associam o líquen escleroso com o carcinoma escamoso vulvar, e também o possível papel da proteína p53 e das claudinas na etiopatogênese da eventual progressão do líquen escleroso para carcinoma escamoso da vulva, propusemo-nos a estudar: a) a expressão das claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 11 em espécimens de tecidos provenientes de pacientes com diagnósticos de líquen escleroso, carcinoma escamoso de vulva (associados ou não) e grupo controle, sem estas doenças , b) a expressão da proteína p53 nestes diferentes espécimens.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Geral

Avaliar a expressão imunoistoquímica das claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 11 e do produto do oncogene TP53 em amostras de tecido vulvar de pacientes com carcinoma escamoso de vulva ou líquen escleroso.

2.2 – Específicos

Avaliar a expressão de claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 11 e da proteína p53 em amostras de tecido vulvar de pacientes com líquen escleroso (LE) ou CEC vulva isolado (ICEC), comparando-a com amostras de tecido vulvar sem estas doenças.

Subdividir o grupo LE em líquen escleroso isolado (ILE) e líquen escleroso associado ao CEC vulvar (LEACEC). Avaliar a expressão das claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 11 e da proteína p53 em pacientes com ILE e LEACEC, comparando-a com a de pacientes com ICEC.

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas neste estudo um total de 45 pacientes atendidas na Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período entre 1993 e 2008, cujos prontuários, lâminas e blocos de tecido vulvar eram disponíveis e que tinham diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de células escamosas da vulva, líquen escleroso vulvar ou a associação das duas doenças.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), protocolo nº. 0971/07.

Os cortes histológicos dos espécimens corados pela técnica histoquímica da hematoxilina e eosina (H/E) tiveram os diagnósticos anatomopatológicos revistos por um mesmo patologista (Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço), e após esta revisão as 45 pacientes foram agrupadas em 3 grupos a saber:

Grupo líquen escleroso (LE): 30 pacientes com diagnóstico de líquen escleroso, associado ou não ao CEC vulvar;

Grupo CEC vulvar isolado (ICEC): 15 pacientes com diagnóstico de CEC vulvar não associado ao líquen escleroso;

Grupo controle: 13 amostras de tecido vulvar humano com ausência de líquen escleroso ou CEC vulvar. Este grupo foi constituído pelas margens livres dos produtos de vulvectomy das pacientes com CEC vulvar isolado ou em associação com líquen escleroso.

Posteriormente, subdivimos o grupo LE em dois subgrupos:

Subgrupo líquen escleroso associado com carcinoma escamoso (LEACEC): 15 pacientes com líquen escleroso associado com carcinoma escamoso;

Subgrupo líquen escleroso isolado, não associado ao carcinoma vulvar (ILE): 15 pacientes com líquen escleroso não associado com carcinoma escamoso.

No subgrupo LEACEC, estudou-se a área de líquen escleroso.

No subgrupo ILE foi estudada a primeira biópsia do caso, ou seja, aquela realizada na primeira consulta da paciente na Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Isto foi feito no intuito de excluir tratamentos prévios ao LE. Além disso, num seguimento mínimo de cinco anos, não houve casos de câncer de vulva neste subgrupo. Entretanto, pela presença de pequena quantidade de material nas amostras deste grupo (ILE), oito casos não foram adequadamente representados nas lâminas de microarranjo de tecido

(TMA). Então, excluímos estes casos, resultando sete espécimens neste subgrupo.

Em todos os grupos foram avaliados o produto do oncogene PT53 e as claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 11.

3.2 – Características das pacientes

Nas 22 pacientes do grupo LE a idade variou de 49 à 88 anos com média de 69,4 anos (Tabela 1). Subdividindo este grupo em ILE e LEACEC, a idade variou de 49 à 88 anos com média de 63,3 anos nos sete casos do grupo ILE (tabela 2). Já nos 15 casos de LEACEC, a idade variou de 54 à 84 anos com média de 72,2 anos (Tabela 2).

Tabela 1 – Idades das pacientes nos grupos LE, ICEC e controle

	N	Média	desvio	I.C. 95%		Mínima	Máxima
				Inferior	Superior		
LE	22	69,4	10,7	64,6	74,1	49	88
ICEC	15	66,2	12,8	59,1	73,3	38	86
Controle	13	69,7	8,3	64,7	74,7	52	79
Geral	50	68,5	10,7	65,5	71,6	38	88

LE = Líquen escleroso.

ICEC = Carcinoma escamoso isolado.

Controle = Tecido vulvar sem líquen escleroso ou carcinoma escamoso.

Tabela 2 - Idades das pacientes nos grupos LEACEC, ILE e ICEC

	N	Média	desvio	I.C. 95%		Mínima	Máxima
				Inferior	Superior		
LEACEC	15	72,20	8,35	67,58	76,82	54	84
ILE	7	63,29	13,11	51,16	75,41	49	88
ICEC	15	66,20	12,84	59,09	73,31	38	86
Geral	37	68,08	11,53	64,24	71,92	38	88

LEACEC = Líquen escleroso associado ao carcinoma escamoso.

ILE = Líquen escleroso isolado.

ICEC = Carcinoma escamoso isolado.

Nas 15 pacientes do grupo ICEC, a idade variou de 38 à 86 anos com média de 66,2 anos (Tabela 1).

O grupo controle foi composto por 13 pacientes com idade variando de 52 à 79 anos, com média de 69,7 anos (Tabela 1).

O subgrupo LEACEC tinha quatro casos no estágio I (26,7%), um no estágio II (6,7%), nove no estágio III (60,0%) e um no estágio IV (6,7%) (tabela 3). O grupo ICEC não possuía casos no estágio I (0,0%), apresentando seis casos no estágio II (40,0%), sete no estágio III (46,7%) e dois no estágio IV (13,3%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição do estadiamento nos grupos ICEC e LEACEC

			Grupo		Total
Estádio	I	n	4	0	4
		%	26,7%	0,0%	13,3%
	II	n	1	6	7
		%	6,7%	40,0%	23,3%
	III	n	9	7	16
		%	60,0%	46,7%	53,3%
	IV	n	1	2	3
		%	6,7%	13,3%	10,0%
Geral	n	15	15	30	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

LEACEC = Líquen escleroso associado ao carcinoma escamoso.

ICEC = Carcinoma escamoso isolado.

3.3 – Confecção do microarranjo de tecido (*tissue microarray* - TMA)

Para a confecção do TMA foi utilizado o aparelho *tissue microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, EUA). A área identificada no bloco doador foi puncionada em dois locais diferentes (selecionadas previamente) com agulha de 1 mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco receptor. As amostras foram realizadas em duplicata totalizando 90 amostras no TMA. O grupo controle foi formado após a confecção do TMA. Sendo assim, estas amostras foram preparadas em lâminas individuais e cada reação realizada em separado.

3.4 – Análise imunoistoquímica dos espécimens

Cortes seriados de 4µm de cada TMA e lâmina do grupo controle foram utilizados para a análise imunoistoquímica das moléculas das claudinas e p53 no material contido no TMA e lâminas. A análise imunoistoquímica foi realizada por meio da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, cujo protocolo é descrito a seguir.

Os cortes de 4µm foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os cortes foram re-hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 85%, respectivamente) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos.

Após a lavagem em água corrente e água destilada, incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% com o intuito de se bloquear a peroxidase endógena tecidual foi realizada.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, os cortes foram imersos duas vezes em solução de TRIS pH 7.4, por dois minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de 1% BSA (Sigma), 5% SFB (Cultilab) em TRIS, pH 7.4, por 60 minutos, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais.

Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma) em TRIS pH 7,4. Recuperação dos sítios antigênicos foi utilizada com citrato pH 6,0. Maiores detalhes das reações constam na Tabela 4.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS pH 7.4, durante 5 minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com o reagente En Vision (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA).

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador 3´3- diaminobenzidina que evidenciou a reação por meio de coloração castanha.

Os cortes então foram lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 10 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol, e montados em resina *permount* para o exame ao microscópio de luz.

Controles negativos das reações supracitadas foram realizados através da incubação de espécimes com soro não-imune substituindo o anticorpo primário.

Tabela 4 - Detalhes dos anticorpos anti-claudina, anti-p53 e das reações antigênicas

Soro primário	Clone	Fonte*	Diluição	Recuperação antigênica
Anti-claudina-1 de Coelho	Policlonal	Zymed	1:400	Citrato, pH 6,0
Anti-claudina-2 de Coelho	Policlonal	Neomarkers	1:400	Citrato, pH 6,0
Anti-claudina-3 de Coelho	Policlonal	Neomarkers	1:500	Citrato, pH 6,0
Anti-claudina-4 de Coelho	Policlonal	Neomarkers	1:200	Citrato, pH 6,0
Anti-claudina-5 de Coelho	Policlonal	Neomarkers	1:1000	Citrato, pH 6,0
Anti-claudina-7 de Coelho	Policlonal	Neomarkers	1:800	Citrato, pH 6,0
Anti-claudina-11 de Coelho	Policlonal	Zymed	1:200	Citrato, pH 6,0
Anti-p53 murino	Monoclonal	Dako	1:50	Citrato, pH 6,0

*Dako, Copenhagen, Dinamarca; Neomarkers, Fremont, Califórnia, EUA; Zymed, São Francisco, Califórnia, EUA.

Todas as reações do TMA e das lâminas do grupo controle foram realizadas em duplicatas.

As reações foram analisadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa e semi-quantitativa.

Os dados foram fotografados com equipamento fotográfico digital.

Na análise das claudinas, separamos em positivo (+), caso houvesse identificação na imunoistoquímica, e negativo (-) na sua ausência. A positividade conferiu coloração amarronzada à lâmina (Figuras 1-4).

3

4

Figuras 1-4: Exemplos de expressão positiva das claudinas nos grupos

Figura 1: expressão positiva de claudina-1 em paciente do grupo ICEC.

Figura 2: expressão positiva de claudina-2 em paciente do subgrupo ILE.

Figura 3: expressão positiva de claudina-3 em paciente do grupo ICEC.

Figura 4: expressão positiva de claudina-4 em paciente do subgrupo LEACEC.

Em relação à expressão de p53, esta foi graduada em escores 0, 1 e 2 à depender de sua expressão no núcleo celular. Na ausência de expressão nas células estudadas foi atribuído escore 0 (zero); expressão em menos de 20% das células analisadas foi conferido escore 1 (um); e

expressão em mais de 20% das células foi classificado como escore 2 (dois). À semelhança das claudinas, a positividade ao p53 também conferiu coloração amarronzada à lâmina (Figura 5).

Figura 5 – expressão positiva de p53 (escore 2) em paciente do grupo ICEC

3.5 – Método estatístico

As médias das idades dos grupos foram comparadas através da técnica de Análise de Variância – “ANOVA”. Associações entre os grupos e as claudinas foram testadas usando a estatística Qui-quadrado – máxima verossimilhança, assim como as associações entre os estádios e as claudinas. Associação entre o escore do marcador p53 e os grupos também foram feitas com base no teste Qui-quadrado. O nível de significância adotado para o estudo foi de 5% ($p < 0,05$).¹²⁸⁻¹³⁰

4- RESULTADOS

4.1 – Idade

Não houve diferença entre as médias etárias entre os grupos LE, ICEC e controle ($p=0,618$) (Tabela 1).

Dividindo o grupo LE em ILE e LEACEC, e pareando com o grupo ICEC, o teste comparativo das médias de idade apontou para indícios de diferença entre os grupos, porém sem significância ($p=0,173$) (Tabela 2).

4.2 – Estadiamento

Os grupos ICEC e LEACEC são heterogêneos em relação ao estadiamento ($p=0,018$) (Tabela 3).

4.3 - Expressão de claudinas e p53 nos grupos LE, ICEC e controle

Comparando os três grupos (LE, ICEC e controle), não houve diferença na expressão das claudinas 1, 2, 3 e 4 (respectivos valores de p

de 0,077; 0,060; 0,218; 0,314) (Tabela 5).

Tabela 5 - Expressão de claudinas e p53 nos grupos LE, ICEC e controle

	LE (%)		ICEC (%)		Controle (%)		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	p
Claudina-1	17(77.7%)	5 (22.3%)	13(86.7%)	2 (13.3%)	13(100.0%)	0 (0.0%)	0.077
Claudina-2	16 (72.7%)	6 (27.3%)	11(73.3%)	4 (26.7%)	10 (76.9%)	3 (23.1%)	0.606
Claudina-3	9 (40.9%)	13 (59.1%)	10(66.7%)	5 (33.3%)	5 (38.5%)	8 (61.5%)	0.218
Claudina-4	11(50.0%)	11(50.0%)	10(66.7%)	5 (33.3%)	5 (38.5%)	8 (61.5%)	0.314
Claudina-5	0 (0.0%)	22(100.0%)	0 (0.0%)	15(100.0%)	2 (15.4%)	11(84.6%)	0.060
Claudina-7	0 (0.0%)	22(100.0%)	0 (0.0%)	15(100.0%)	3 (23.1%)	10(76.9%)	0.013*
Claudina-11	0 (0.0%)	22(100.0%)	0 (0.0%)	15(100.0%)	5 (38.5%)	8 (61.5%)	0.001*
p53 0	15 (68.2%)		6 (40.0%)		12 (92.3%)		0.017*
1	2 (9.1%)		5 (33.3%)		1 (7.7%)		
2	5 (22.7%)		4 (26.7%)		0 (0.0%)		
LE =		Líquen escleroso.					
ICEC =		Carcinoma escamoso isolado.					
Controle =		Tecido vulvar sem líquen escleroso ou carcinoma escamoso.					
* =		p<0,05					

Por outro lado, houve diferença na expressão das claudinas 5, 7 e 11. Esta diferença ocorreu no grupo controle, já que estas proteínas não foram expressas nos grupos LE e ICEC. Entretanto, isto não foi significativo para a claudina-5 (p=0,060). O mesmo não ocorreu com as claudinas 7 e 11, onde a diferença foi significativa (respectivos valores de p de 0,013 e 0,001)

(Tabela 5).

Em relação ao p53, a distribuição de positividade desta proteína variou conforme o grupo estudado. Sendo assim, sua expressão foi máxima no grupo ICEC, seguido pelo grupo LE e, com a mínima expressão, pelo grupo controle ($p=0,017$) (Tabela 5).

4.4 - Expressão de claudinas e p53 nos grupos ICEC, LEACEC e ILE

Dividindo o grupo LE em ILE e LEACEC, comparamos a expressão de claudinas e p53 nestes subgrupos com o grupo ICEC. Não houve diferença nestes três grupos com estas proteínas estudadas. Também não houve expressão das claudinas 5, 7 e 11 em quaisquer destes grupos. O respectivo valor de p obtido para as claudinas 1, 2, 3, 4 e p53 foi de 0,614; 0,995; 0,058; 0,540; e 0,070 (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão de claudinas e p53 nos grupos ICEC, LEACEC e ILE

		LEACEC (%)		ILE (%)		ICEC (%)		
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	p
	Claudina-1	11(73.3%)	4 (26.7%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)	13(86.7%)	2(13.3%)	0.614
	Claudina-2	11 (73.3%)	4 (26.7%)	5 (75.4%)	2 (24.6%)	11 (73.3%)	4 (26.7%)	0.995
	Claudina-3	8 (53.3%)	7 (46.7%)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	10 (66.7%)	5 (33.3%)	0.058
	Claudina-4	7 (46.7%)	8 (53.3%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	10 (66.7%)	5 (33.3%)	0.540
	Claudina-5	0 (0.0%)	15 (100.0%)	0 (0.0%)	7 (100.0%)	0 (0.0%)	15(100.0%)	
	Claudina-7	0 (0.0%)	15 (100.0%)	0 (0.0%)	7 (100.0%)	0 (0.0%)	15(100.0%)	
	Claudina-11	0 (0.0%)	15 (100.0%)	0 (0.0%)	7 (100.0%)	0 (0.0%)	15(100.0%)	
p53	0	9 (60.0%)		6 (85.7%)		6 (40.0%)		0.070
	1	1 (6.7%)		1 (14.3%)		5 (33.3%)		
	2	5 (33.3%)		0 (0.0%)		4 (26.7%)		
LEACEC =		Líquen escleroso associado à carcinoma escamoso .						
ILE =		Líquen escleroso isolado.						
ICEC =		Carcinoma escamoso isolado.						

4.5 - Expressão de claudinas e p53 no estadiamento do grupo ICEC

Não houve comportamento diferenciado das claudinas 1, 2, 3 e 4 nos diferentes estádios clínicos (respectivos valores de p: 0,165; 0,501; 0,857 e 0,322) (Tabela 7). As claudinas 5, 7 e 11 foram negativas para todas as pacientes neste grupo.

Tabela 7 - Distribuição conjunta do estágio clínico e claudinas no grupo ICEC

		Estádio			Total	p
			II	III	IV	
Claudina-1	Negativo	n	1	0	1	2
		%	16,7%	0,0%	50,0%	13,3%
	Positivo	n	5	7	1	13
		%	83,3%	100,0%	50,0%	86,7%
Claudina-2	Negativo	n	2	2	0	4
		%	33,3%	28,6%	0,0%	26,7%
	Positivo	n	4	5	2	11
		%	66,7%	71,4%	100,0%	73,3%
Claudina-3	Negativo	n	2	2	1	5
		%	33,3%	28,6%	50,0%	33,3%
	Positivo	n	4	5	1	10
		%	66,7%	71,4%	50,0%	66,7%
Claudina-4	Negativo	n	3	1	1	5
		%	50,0%	14,3%	50,0%	33,3%
	Positivo	n	3	6	1	10
		%	50,0%	85,7%	50,0%	66,7%
Total estágio		n	6	7	2	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

ICEC = Carcinoma escamoso isolado.

Também não houve associação significativa entre p53 e os estádios clínicos para o grupo ICEC ($p=0,637$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição conjunta do estágio clínico e p53 no grupo ICEC

		Estádio			Total
			II	III	IV
p53	0	n	3	2	1
		%	50,0%	28,6%	50,0%
	1	n	2	2	1
		%	33,3%	28,6%	50,0%
	2	n	1	3	0
		%	16,5%	42,9%	0,0%
Total grupo	do	n	6	7	2
		%	100,0%	100,0%	100,0%

ICEC = Carcinoma escamoso isolado.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Idade e estadiamento

A incidência de CEC vulvar isoladamente geralmente ocorre em idades inferiores à incidência de CEC vulvar associado ao LE (Sideri, 2005; Scurry, 2006).^{20,21} Isto decorre das vias patogénéticas distintas implicadas com o carcinoma escamoso da vulva, uma envolvida com o HPV e outra com LE (van der Avoort, 2006).¹⁹ Sendo assim, as lesões precursoras do tipo usual, mais frequentes e relacionadas ao HPV, incidem em pacientes mais jovens. Em contrapartida, as lesões do tipo diferenciado, identificado com mais dificuldade e associado ao LE, ocorrem em mulheres mais idosas (Sideri, 2005; Scurry, 2006).^{20,21} O nosso material mostrou uma tendência, embora sem significância, neste sentido ($p=0,173$), estando os casos do subgrupo LEACEC numa média etária acima das pacientes do grupo ICEC.

Em relação ao estadiamento, apesar da vulva ser um órgão externo, a maioria dos casos encontrados foi em estádios avançados. Mais ainda, no grupo ICEC não houve nenhum caso no estágio inicial (estádio I). Nossos dados estão em concordância com a literatura (Souen, 2001; FIGO, 2003).^{1,4}

5.2 – Claudina-1

Um aumento na expressão de claudina-1 foi observado na progressão das lesões intraepiteliais do colo uterino ao carcinoma cervical. Ou seja, as lesões precursoras de baixo grau apresentavam níveis de claudina-1 menores que as de alto grau e as de carcinoma invasivo de cérvix uterina (Lee, 2005; Sobel, 2005).^{100,101} Isto sugere um papel de destaque deste marcador no início da carcinogênese cervical.

A claudina-1, em relação ao carcinoma de endométrio, mostrou utilidade na diferenciação entre o tipo I (endometrióide) e o tipo II (não endometrióide). No tipo I, há menor expressão desta claudina no carcinoma e nas hiperplasias, ao contrário do tipo II, em que ocorre superexpressão da mesma (Sobel, 2006; Szabó, 2009).¹³¹⁻²

Nosso trabalho mostrou expressão desta proteína em tecido vulvar nos grupos LE, ICEC, e controle. Entretanto, as distribuições de claudina-1 nestes grupos foram similares. Também não houve diferença quando comparamos o grupo ICEC com os subgrupos ILE e LEACEC.

Em relação ao prognóstico, uma menor expressão de claudina-1 foi associada com pior evolução no câncer de cólon (Resnick, 2005).¹⁰⁸ Mais ainda, também se correlacionou baixos índices de claudina-1 com maior taxa de recorrência de câncer de esôfago (Miyamoto, 2008).¹⁰⁹

Na ginecologia, particularmente no carcinoma de mama, foi verificado uma associação entre menor expressão de claudina-1 com maior incidência de recorrência (Morohashi, 2007).¹¹⁸

Em nosso material, no grupo ICEC houve indícios de diferença, embora sem significância, entre as distribuições nos estádios ($p=0,165$). Foi observado que o estágio IV teve menor expressão da claudina-1. Isto sugere que uma diminuição de expressão da claudina-1 esteja associada com estádios mais avançados.

5.3 – Claudina-2

À semelhança do observado com a claudina-1, uma maior expressão de claudina-2 também foi observada na progressão das lesões intraepiteliais do colo uterino ao carcinoma cervical. Houve menor expressão desta claudina no tecido normal em comparação aos tecidos com lesões precursoras ou câncer invasivo (Sobel, 2005).¹⁰¹

Em relação ao carcinoma de endométrio, a claudina-2, assim como a claudina-1, também apresentou utilidade na diferenciação entre o tipo I (endometrióide) e o tipo II (não endometrióide). Entretanto, ao contrário do observado com a claudina-1, no tipo I houve maior expressão da claudina-2 no carcinoma e nas hiperplasias do que no tipo II, onde estas claudinas se encontravam pouco expressas (Sobel, 2006; Szabó, 2009).¹³¹⁻²

Nosso trabalho mostrou expressão deste marcador em tecido vulvar nos grupos LE, ICEC, e controle. Contudo, as distribuições de claudina-2 nestes grupos foram similares. Também não houve diferença quando comparamos o grupo ICEC com os subgrupos ILE e LEACEC.

No câncer de mama foi demonstrado que uma menor expressão de claudina-2 estava associada com doença mais avançada (Kim, 2008).¹²¹

Em nosso material, no grupo ICEC não houve diferença entre as distribuições de claudina-2 nos estádios.

5.4 – Claudina-3

A claudina-3 tem importância destacada na ginecologia. Há uma associação entre superexpressão de claudina-3 e carcinoma epitelial de ovário (Agarwal, 2005; Zhu, 2006; Choi, 2007).^{103,107,115} Maiores níveis desta claudina também estão mais relacionados ao adenocarcinoma de ovário do que aos tumores *borderline* e benignos deste órgão. (Rangel, 2003; Zhu, 2006; Choi, 2007).^{103,115,133} Esta expressão também se mostrou positiva quando comparados tumores pouco diferenciados ou indiferenciados de ovário (maior expressão de claudina-3) com tumores bem diferenciados (menor expressão de claudina-3) (Zhu, 2006).¹⁰³

Em relação ao útero, uma maior expressão de claudina-3 foi associada a um maior grau de invasão miometrial no carcinoma de endométrio (Pan, 2007).¹¹⁷ Além disto, a claudina-3, também mostrou

aplicabilidade na diferenciação entre o tipo I (endometrióide) e o tipo II (não endometrióide), encontrando-se mais expressa no carcinoma seroso e no de células claras (tipo II) (Santin e Marizzoni, 2007; Konecny, 2008).^{97,134} Observou-se também maior expressão desta claudina nos carcinossarcomas uterinos (Santin e Siegel, 2007).⁹⁸

Estudando pacientes com endometriose, verificou-se uma menor expressão desta claudina nos focos de endometriose peritoneal (denominado “endométrio ectópico”) quando comparados com o endométrio uterino (denominado “endométrio tópico”) (Gaetje, 2008; Pan, 2009).¹³⁵⁻⁶

Nosso trabalho mostrou expressão deste marcador em tecido vulvar nos grupos LE, ICEC, e controle. As distribuições de claudina-3 nestes grupos foram semelhantes. Também notamos menor expressão desta claudina no subgrupo ILE quando comparado ao subgrupo LEACEC e grupo ICEC, embora sem significância.

No carcinoma de esôfago, uma menor expressão da claudina-3 foi associada com presença de metástases (Takala, 2007).¹¹²

Com relação à ginecologia, uma maior expressão da claudina-3 mostrou uma correlação negativa com sobrevida no carcinoma de ovário (Choi, 2007).¹¹⁵ Mais ainda, num modelo animal (camundongos), o silenciamento do gene da claudina-3 provocou supressão do crescimento neoplásico e de metástases de tumores ovarianos, sugerindo uma aplicação prática desta claudina (Huang, 2009).¹³⁷ Corroborando estes achados, quando usado a enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE), um ligante

natural da claudina-3, com o fator de necrose tumoral (TNF), houve uma maior resposta citotóxica nas células de câncer de ovário humanas (Yuan, 2009).¹³⁸ Como é sabido que o câncer de ovário tem superexpressão desta claudina, há a perspectiva de uma terapia alvo com menor efeito sistêmico colateral. Além disto, esta aplicabilidade poderia se estender ao carcinossarcoma uterino e ao carcinoma endometrial, principalmente do tipo não endometrióide (tipo II), nos quais também ocorre maior expressão de claudina-3 (Pan, 2007; Santin e Marizzoni, 2007; Santin e Siegel, 2007; Konecny, 2008).^{97-8,117,134}

Em nosso material, no grupo ICEC não houve diferença entre as distribuições de claudina-3 nos estádios.

5.5 – Claudina-4

A claudina-4 possui comportamento semelhante ao da claudina-3 nos tumores ginecológicos. Sendo assim, maiores níveis de claudina-4 também foram mais associados ao adenocarcinoma de ovário do que aos tumores *borderline* e benignos deste órgão. (Choi, 2007).¹¹⁵ Em relação ao útero, uma maior expressão de claudina-4 foi igualmente relacionada a um maior grau de invasão miometrial no carcinoma de endométrio (Pan, 2007).¹¹⁷

Nosso trabalho mostrou expressão deste marcador em tecido vulvar nos grupos LE, ICEC, e controle. Porém, as distribuições de claudina-4

nestes grupos foram similares. Também não houve diferença quando comparamos o grupo ICEC com os subgrupos ILE e LEACEC.

Em relação ao prognóstico, no carcinoma de esôfago, uma menor expressão da claudina-4, à semelhança do observado com a claudina-3, foi associada com presença de metástases (Takala, 2007).¹¹²

Em nosso material, no grupo CEC não houve diferença entre as distribuições de claudina-4 nos estádios.

5.6 – Claudina-5

Uma maior expressão de claudina-5 está relacionada com metástase linfonodal no câncer de esôfago. Esta informação é útil quando se opta por ressecção endoscópica de um tumor inicial, onde não é realizada a exérese de linfonodos (Chiba, 2009).¹³⁹ Já em relação ao hepatocarcinoma, uma menor expressão de claudina-5 se associou com pior prognóstico (Sakaguchi, 2008).¹⁴⁰

Em ginecologia, esta claudina foi estudada nas lesões epiteliais de ovário. Porém, como sua expressão ocorre principalmente em células endoteliais, sua importância neste órgão se mostrou pequena (Soini, 2006).

¹⁴¹ Em relação à neoplasia mamária, esta claudina foi detectada na doença de Paget e no carcinoma mamário, estando mais expressa no tipo ductal do que no lobular (Soiny, 2004).¹⁴²

Nosso trabalho não mostrou expressão desta claudina nos grupos com doença, ou seja, com LE e/ou CEC. Houve expressão desta claudina no grupo controle, porém sem significância.

5.7 – Claudina-7

Assim como observado com as claudinas 1 e 2, demonstrou-se aumento na expressão de claudina-7 na progressão das lesões intraepiteliais do colo uterino ao carcinoma cervical. Ou seja, esta claudina também está implicada no início da carcinogênese cervical (Lee, 2005; Sobel, 2005).^{100,101} Em relação a outras neoplasias, a claudina-7 teve pouca expressão nos cânceres de mama e de cabeça e pescoço, porém esteve superexpressa no câncer de estômago (Hewitt, 2006).⁹⁶

Em termos prognósticos, encontrou-se uma menor expressão de claudina-7 associada com invasão vascular e metástase hepática no câncer de cólon e uma relação com disseminação linfonodal no câncer de esôfago (Usami, 2006; Oshima, 2008).^{110,111} Uma menor expressão desta claudina também foi associada à pior prognóstico no CEC oral, estando sua ausência mais freqüente em estádios avançados.¹⁴³⁻⁴

Nos cânceres ginecológicos, uma maior expressão de claudina-7 mostrou uma correlação negativa com sobrevida e menor intervalo livre de doença no carcinoma de ovário (Kleinberg, 2008).¹¹⁶ No carcinoma de mama, uma menor expressão de claudina-7 foi encontrada em tumores de

grau histológico maior, além de associação com incidência mais alta de metástases (Kominsky, 2003; Sauer, 2005).^{119,120}

Em nosso material não houve expressão desta claudina nos grupos com doença, ou seja, com LE e/ou CEC. Houve expressão desta claudina no grupo controle. A perda de expressão desta claudina no tecido vulvar pode ser etapa no processo de carcinogênese deste órgão.

5.8 – Claudina-11

Em modelos animais, a claudina-11 se mostrou superexpressa no cistoadenoma seroso de ovário (Aravindakshan, 2006).¹⁰² Em humanos, temos que uma menor expressão desta claudina facilita a mobilidade e a invasão das células de carcinoma gástrico (Agarwal, 2009).¹⁴⁵

Em nosso material não houve expressão desta claudina nos grupos com doença, ou seja, com LE e/ou CEC. Houve expressão desta claudina no grupo controle. A perda de expressão desta claudina no tecido vulvar, à semelhança do que foi observado com a claudina-7, pode também fazer parte do processo de carcinogênese da vulva.

5.9 – p53

A superexpressão da proteína p53 não ocorre só no CEC vulvar, mas também em doenças benignas, como LE (Carlson, 1998; Rolfe, 2001; Liegl, 2004; Liegl, 2006).^{22,82-84} Porém, restam dúvidas se essa maior expressão se deve à tumorigênese ou ao mecanismo de reparo celular frente à injúria (Bosari, 1993; Carlson, 1998; Rolfe, 2001).^{22,82,85} O acompanhamento de pacientes com LE que, no futuro desenvolvem CEC vulvar, sugere uma relação maior com tumorigênese. Isto se deve principalmente à constatação de que biópsias prévias de LE, que acabaram evoluindo para CEC, apresentavam altos níveis de p53 (Carlson, 1998; Rolfe, 2001).^{82,85}

Nosso trabalho mostrou expressão deste marcador em tecido vulvar nos grupos LE, ICEC, e controle. As distribuições de p53 nestes grupos foram distintas. Houve menor expressão deste marcador no grupo controle, seguido pelo LE e, com a maior expressão, o grupo ICEC. Estes dados refletem os achados da literatura, sugerindo também que maior expressão de p53 seja fator de risco para progressão para CEC. Quando comparamos o grupo ICEC com os subgrupos ILE e LEACEC, houve maior expressão de p53 nos casos de ICEC e LEACEC, porém sem significância.

No grupo ICEC não houve diferença entre as distribuições de p53 nos estádios.

6 – CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem as seguintes conclusões:

1. As claudinas 1, 2, 3 e 4 se expressaram igualmente nos grupos LE, ICEC e controle;
2. As claudinas 5, 7 e 11 não se expressaram nos grupos com doença (LE e ICEC);
3. As claudinas 7 e 11 se expressaram no grupo controle;
4. Registrou-se maior expressão de p53 no grupo ICEC, seguido pelo LE e, menor, no grupo controle;
5. As claudinas 1, 2, 3, 4 e a proteína p53 se expressaram igualmente nos casos de ILE, LEACEC e ICEC.

7 - REFERÊNCIAS¹

- 1- FIGO Committee on Gynecologic Oncology and IGCS Guidelines Committee. *Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers*. 2nd ed.; 2003.
- 2- Hullu JA, van der Zee AGJ. Surgery and radiotherapy in vulvar cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 60(1): 38-58.
- 3- Fons G, Burger MP, Kate FJ, van der Velden J. Identification of potential prognostic markers for vulvar cancer using immunohistochemical staining of tissue microarrays. *Int J Gynecol Pathol*. 2007; 26:188-93.
- 4- Souen J, Carvalho JP, Pinotti JA. *Oncologia Genital Feminina*. 2^a. ed. São Paulo: Roca; 2001.
- 5- Howe HL, Wingo PA, Thun MJ et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with increasing trends. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93: 824-42.
- 6- MacLean AB. Vulval cancer: the past 100 years, and into the next century: the Presidential Oration, British Society for the Study of Vulval Disease, 2002. *J Obstet Gynaecol*. 2004; 24(5): 491-7.
- 7- MacLean AB. Vulval cancer: prevention and screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006; 20(2): 379-95.
- 8- Makar AP, Scheistron M, van den Weyngaert D, Trope CG. Surgical management of stage I and II vulvar cancer: the role of the sentinel node biopsy. Review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*. 2001; 11: 255-62.
- 9- Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrão F, Villa LL. Squamous Cell Carcinoma of the Vulva in Brazil: Prognostic Importance of Host and Viral Variables. *Gynecol Oncol*. 1999; 74, 61–7.

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
 Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Fredi, Maria f. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Sueli C. Cardoso, Valéria Vilhena, 2^a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.
 Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

- 10- Lanneau GS, Argenta PA, Lanneau MS, Riffenburgh RH, Gold MA, McMeekin DS, Webster N, Judson PL. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 200(6):645.e1-5.
- 11- Lerma E, Matias-Guiu X, Lee SJ, Prat J. Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53, and pRb. *Int J Gynecol Pathol.* 1999; 18(3):191-7.
- 12- Pinto AP, Schlecht NF, Pintos J, Kaiano J, Franco EL, Crum CP, Villa LL. Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004; 92(3):856-65.
- 13- Raspagliesi F, Hanozet F, Ditto A, Solima E, Zanaboni F, Vecchione F, Kusamura S. Clinical and pathological prognostic factors in squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2006; 102(2):333-7.
- 14- Monk BJ, Burger RA, Lin F, Parham G, Vasilev SA, Wilczynski SP. Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1995; 85(5 Pt 1):709-15.
- 15- Growdon WB, Boisvert SL, Akhavanfard S, Oliva E, Dias-Santagata DC, Kojiro S, Horowitz NS, Iafrate AJ, Borger DR, Rueda BR. Decreased survival in EGFR gene amplified vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2008; 111(2):289-97.
- 16- Preti M, Mezzetti M, Robertson C, Sideri M. Inter-observer variation in histopathological diagnosis and grading of vulvar intraepithelial neoplasia: results of an European Collaborative Study. *BJOG.* 2000; 107(5):594-9.
- 17- Scurry J, Champion M, Scurry B, Kim SN, Kacker N. Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2006; 25(2):176-81.
- 18- Jones RW, Rowan DM, Stewart AW. Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. *Obstet Gynecol.* 2005; 106(6):1319-26.
- 19- van der Avoort IA, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JM, de Hullu JA, de Wilde PC, Bulten J, Melchers WJ, Massuger LF. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol.* 2006; 25(1):22-9.
- 20- Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ, Preti M, Heller DS, Scurry J, Haefner H, Neill S. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004

modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med.* 2005; 50(11):807-10.

- 21- Scurry J, Wilkinson EJ. Review of terminology of precursors of vulvar squamous cell carcinoma. *J Low Genit Tract Dis.* 2006; 10(3):161-9.
- 22- Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, Figge H, Mihm MC. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. *Hum Pathol.* 1998; 29(9): 932-48.
- 23- van Seters M, ten Kate FJ, van Beurden M, Verheijen RH, Meijer CJ, Burger MP, Helmerhorst TJ. In the absence or (early) invasive carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia associated with lichen sclerosus is mainly of undifferentiated type: new insights in histology and aetiology. *J Clin Pathol.* 2007; 60(5):504-9.
- 24- August PJ, Milward TM. Cryosurgery in the treatment of lichen sclerosus et atrophicus of the vulva. *Br J Dermatol.* 1980; 103: 667-70.
- 25- Eng AM, Jacobs RA. Lichen sclerosus et atrophicus and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 1980; 7: 123-4.
- 26- di Paola GR, Leverone NGR, Belardi MG. Recurrent vulvar malignancies in an 11 year prospectively followed vulvar dystrophy: a gynaecologist's permanent concern. *Gynecol Oncol.* 1983; 15: 120-1.
- 27- Cario GM, House MJ, Paradinas FJ. Squamous cell carcinoma of the vulva in association with mixed vulvar dystrophy in an 18 year old girl: case report. *Br J Obstet Gynaecol.* 1984; 91: 87-90.
- 28- Lindeque BG, Nel AE, Du Toit JP. Immune deficiency and invasive carcinoma of the vulva in a young woman: a case report. *Gynaecol Oncol.* 1987; 26: 112-18.
- 29- Roman LD, Mitchell MF, Burke TW, Silva EG. Unsuspected invasive squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *Gynaecol Oncol.* 1991; 41(2): 182-5.
- 30- Jeffcoate TNA, Woodcock AS. Premalignant conditions of the vulva, with particular reference to chronic epithelial dystrophies. *Br Med J.* 1961; 2(5245): 127-34.
- 31- Wallace HJ. Lichen sclerosus et atrophicus. *Trans St Johns Hosp Dermatol Soc.* 1971; 57:9.

- 32- Hart WR, Norris HJ, Elwig EB. Relation of lichen sclerosis et atrophicus of the vulva to the development of carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1975; 45:369-77.
- 33- Friedrich EG. Vulval dystrophy. *Clin Obstet Gynecol.* 1985, 28:178-87.
- 34- Meyrick Thomas RH, Ridley CM, McGibbon DH, Black MM. Lichen sclerosis et atrophicus and autoimmunity – a study of 350 women. *Br J Dermatol.* 1988; 118:41.
- 35- Meffert JJ, Davis BM, Grimwood RE. Lichen sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 1995, 32:393-416.
- 36- Rolfe KJ, MacLean AB, Crow JC, Benjamin E, Reid WMN, Perrett CW. TP53 mutations in vulval lichen sclerosis adjacent to squamous cell carcinoma of the vulva. *Br J Cancer.* 2003; 89:2249-53.
- 37- Pugliese JM, Morey AF, Peterson AC. Lichen Sclerosis: Review of the Literature and Current Recommendations for Management. *J Urol.* 2007;178(6):2268-76.
- 38- Powell JJ, Wofnarowska F. Lichen sclerosis. *Lancet.* 1999; 353:1777-83.
- 39- Val I, Almeida G. An overview of lichen sclerosis. *Clin Obstet Gynecol.* 2005; 48:808.
- 40- Yesudian PD, Sugunendran H, Bates CM; O'Mahony C. Lichen sclerosis. *Int J STD AIDS.* 2005; 16(7):465-73, test 474.
- 41- Dogliotti M, Bentley-Phillips CB, Schmaman AS. Lichen sclerosis et atrophicus in the Bantu. *Br J Dermatol.* 1974; 91:81.
- 42- Wang J. Histopathological and ultrastructural studies of lichen sclerosis et atrophicus of the vulva. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 1991; 13:327.
- 43- Neill SM, Totnall FM, Cox NH. Guidelines for the management of lichen sclerosis. *Br J Dermatol.* 2002; 147:640-9.
- 44- Ramrakha-Jones VS, Paul M, McHenry P, Burden AD. Nail dystrophy due to lichen sclerosis? *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26:507.
- 45- Jensen T, Worsaae N, Melgaard B. Oral lichen sclerosis et atrophicus: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94:702.
- 46- Regauer S. Immune dysregulation in lichen sclerosis. *Eur J Cell Biol.* 2005; 84:273.

- 47- Weide B, Walz T, Garbe C. Is morphoea caused by *Borrelia burgdorferi*? A review. *Br J Dermatol*. 2000; 142:636.
- 48- Drut RM, Gomez MA, Drut R, Lojo MM. Human papillomavirus is present in some cases of childhood penile lichen sclerosis: an in situ hybridization and SP-PCR study. *Pediatr Dermatol*. 1998; 15:85.
- 49- Beattie PE, Dawe RS, Ferguson J, Ibbotson SH. UVA1 phototherapy for genital lichen sclerosis. *Clin Exp Dermatol*. 2006; 31:343.
- 50- Neill SM, Lessana-Leibowitch M, Pelisse M, Moyal-Barracco M. Lichen sclerosis, invasive squamous cell carcinoma, and human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol*. 1990; 162:1633.
- 51- Requena L, Kutzner H, Escalonilla P, Ortiz S, Schaller J, Rohwedder A. Cutaneous reactions at sites of herpes zoster scars: an expanded spectrum. *Br J Dermatol*. 1998; 138:161.
- 52- Yashar S, Han KF, Haley JC. Lichen sclerosis – lichen planus overlap in a patient with hepatitis C virus infection. *Br J Dermatol*. 2004; 150:168.
- 53- Skierlo P, Heise H. Testosterone propionate ointment – a therapeutic trial in lichen sclerosis et atrophicus. *Hautarzt*. 1987; 38:295.
- 54- Kohlberger PD, Joura EA, Bancher D, Gitsch S, Breitenacker G, Kieback DG. Evidence of androgen receptor expression in lichen sclerosis: an immunohistochemical study. *J Soc Gynecol Investig*. 1998; 5:331.
- 55- Miller RA. The Koebner phenomenon. *Int J Dermatol*. 1982; 21:192.
- 56- Pock L. Koebner phenomenon in lichen sclerosis et atrophicus. *Dermatologica*. 1990; 181:76.
- 57- Pass CJ. An unusual variant of lichen sclerosis et atrophicus: delayed appearance in a surgical scar. *Cutis*. 1984; 33:405.
- 58- Yates VM, King CM, Dave VK. Lichen sclerosis et atrophicus following radiation therapy. *Arch Dermatol*. 1985; 121:1044.
- 59- Milligan A, Graham-Brown RA, Burns DA. Lichen sclerosis et atrophicus following sunburn. *Clin Exp Dermatol*. 1988; 13:36.
- 60- Leibowitch M, Neill S, Pelisse M, Moyal-Baracco M. The epithelial changes associated with squamous cell carcinoma of the vulva: a review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990; 97:1135.

- 61- Scurry J, Whitehead J, Healey M. Histology of lichen sclerosus varies according to site and proximity to carcinoma. *Am J Dermatol.* 2001; 23:413-8.
- 62- Chiesa-Vottero A, Dvoretzky PM, Hart WR. Histopathologic study of thin vulvar squamous cell carcinomas and associated cutaneous lesions: a correlative study of 48 tumors in 44 patients with analysis of adjacent vulvar intraepithelial neoplasia types and lichen sclerosus. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(3):310-8.
- 63- Roberto Netto A, Ribalta JCL, Focchi J, Focchi GRA. Dermatoses Vulvares – Revisão de Tema. *Femina.* 2006; 12(34):793-800.
- 64- Kurman RJ. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* New York: Springer; 2002.
- 65- Martins NV, Ribalta JCL. *Patologia do Trato Genital Inferior.* 1^a. ed. São Paulo: Roca; 2005.
- 66- Bracco GL, Carli P, Sonni L, Maestrini G, De Marco A, Taddei GL et al. Clinical and histologic effects of topical treatments of vulval lichen sclerosus. A critical evaluation. *J Reprod Med.* 1993; 38:37.
- 67- Friedrich EG Jr. Topical testosterone for benign vulvar dystrophy. *Obstet Gynecol.* 1971; 37:677.
- 68- Sideri M, Origoni M, Spinaci L, Ferrari A. Topical testosterone in the treatment of vulvar lichen sclerosus. *Gynaecol Obstet.* 1994; 46:53.
- 69- Bousema MT, Romppanen U, Geiger JM, Baudin M, Vaha-Eskeli K, Vartiainen J et al. Acitretin in the treatment of severe lichen sclerosus et atrophicus of the vulva: a double-blind, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 30:225.
- 70- Basak PY, Basak K. Lichen sclerosus et atrophicus of the scalp: satisfactory response to acitretin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002; 16:183.
- 71- Penneys NS. Treatment of lichen sclerosus with potassium para-aminobenzoate. *J Am Acad Dermatol.* 1984; 10:1039.
- 72- Wakelin SH, James MP. Extensive lichen sclerosus et atrophicus with bullae and ulceration – improvement with hydroxychloroquine. *Clin Exp Dermatol.* 1994; 19:332.
- 73- Parsad D, Saini R. Oral stanozolol in lichen sclerosus et atrophicus. *J Am Acad Dermatol.* 1998; 38:278.

- 74- Ronger S, Viallard AM, Meunier-Mure F, Chouvet B, Balme B, Thomas L. Oral calcitriol: a new therapeutic agent in cutaneous lichen sclerosis. *J Drugs Dermatol*. 2003; 2:23.
- 75- Kastner U, Altmeyer P. Cryosurgery – the last resort or a surgical alternative in the treatment of lichen sclerosus et atrophicus of the vulva (LSAV)? *J Dtsch Dermatol Ges*. 2003; 1:206.
- 76- Rosemberg SK, Jacobs H. Continuous wave carbon dioxide treatment of balanitis xerotica obliterans. *Urology*. 1982; 19:539.
- 77- Rouzier R, Haddad B, Deyrolle C, Pelisse M, Moyal-Barracco M, Paniel BJ. Perineoplasty for the treatment of introital stenosis related to vulvar lichen sclerosus. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186:49.
- 78- Kuribayashi K, El-Deiry WS. Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 615:201-21.
- 79- Corney DC, Flesken-Nikitin A, Choi J, Nikitin AY. Role of p53 and Rb in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 622:99-117.
- 80- Lahat G, Lazar A, Lev D. Sarcoma epidemiology and etiology: potential environmental and genetic factors. *Surg Clin North Am*. 2008; 88(3):451-81.
- 81- Tomkova K, Tomka M, Zajac V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma*. 2008; 55(3):177-81.
- 82- Rolfe KJ, Eva LJ, MacLean AB, Crow JC, Perrett CW, Reid WMN. Cell cycle proteins as molecular markers of malignant change in vulvar lichen sclerosus. *Int J Gynecol Cancer*. 2001; 11:113-18.
- 83- Liegl B, Regauer S. p53 immunostaining in lichen sclerosus – an under recognized feature? *Histopathology*. 2004; 45:237-44.
- 84- Liegl B, Regauer S. Vasculitis in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN). *Histopathology*. 2006; 48:268-74.
- 85- Bosari S, Roncalli M, Vale G. p53 imunoreactivity in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. *J Pathol*. 1993; 169:425-30.
- 86- Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003; 36(3):147-56.

- 87- Utech M, Brüwer M, Nusrat A. Tight junctions and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol.* 2006; 341:185-95.
- 88- Koval M. Claudins - key pieces in the tight junction puzzle. *Cell Commun Adhes.* 2006; 13(3):127-38.
- 89- Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda SI, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y, Yagi K. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol.* 2009; 76(4):918-26.
- 90- Wodarz A, Näthke I. Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(9):1016-24.
- 91- Itallie CM, Anderson JM. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; 1:38–41.
- 92- Balkovetz DF. Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290: F572–9.
- 93- Kondoh M, Takahashi A, Fujii M, Yagi K, Watanabe Y. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(9):1783-9.
- 94- Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 2005; 65(21):9603-6.
- 95- Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(6):919-28.
- 96- Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer.* 2006; 6:186.
- 97- Santin AD, Bellone S, Marizzoni M, Palmieri M, Siegel ER, McKenney JK, Hennings L, Comper F, Bandiera E, Pecorelli S. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). *Cancer.* 2007; 109(7):1312-22.
- 98- Santin AD, Bellone S, Siegel ER, McKenney JK, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Tognon G, Bandiera E, Pecorelli S. Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(11):3339-46.
- 99- Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM. Expression of Tight Junction Protein Claudin-4 in Basal-Like Breast Carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2009; 15(1):59-64.

- 100- Lee JW, Lee SJ, Seo J, Song SY, Ahn G, Park CS, Lee JH, Kim BG, Bae DS. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2005; 97(1):53-9.
- 101- Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol*. 2005; 36(2):162-9.
- 102- Aravindakshan J, Chen X, Sairam MR. Differential expression of claudin family proteins in mouse ovarian serous papillary epithelial adenoma in aging FSH receptor-deficient mutants. *Neoplasia*. 2006; 8(12): 984-94.
- 103- Zhu Y, Brännström M, Janson PO, Sundfeldt K. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *Int J Cancer*. 2006; 118(8):1884-91.
- 104- Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*. 2005; 46(5):551-60.
- 105- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 2003; 22:2021-33.
- 106- Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann KH, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Lohr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2003; 63:6265-71.
- 107- Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res*. 2005; 65:7378-85.
- 108- Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol*. 2005; 18:511-18.
- 109- Miyamoto K, Kusumi T, Sato F, Kawasaki H, Shibata S, Ohashi M, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Res*. 2008; 29(2):71-6.

- 110- Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol.* 2006; 37(5):569-77.
- 111- Oshima T, Kunisaki C, Yoshihara K, Yamada R, Yamamoto N, Sato T, Makino H, Yamagishi S, Nagano Y, Fujii S, Shiozawa M, Akaike M, Wada N, Rino Y, Masuda M, Tanaka K, Imada T. Reduced expression of the claudin-7 gene correlates with venous invasion and liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2008; 19(4):953-9.
- 112- Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y. Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS.* 2007; 115(7):838-47.
- 113- Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Downregulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol.* 2006; 208:633-42.
- 114- Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:551-6.
- 115- Choi YL, Kim J, Kwon MJ, Choi JS, Kim TJ, Bae DS, Koh SS, In YH, Park YW, Kim SH, Ahn G, Shin YK. Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic correlation. *Histol Histopathol.* 2007; 22(11):1185-95.
- 116- Kleinberg L, Holth A, Trope CG, Reich R, Davidson B. Claudin upregulation in ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival. *Hum Pathol.* 2008; 39(5):747-57.
- 117- Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17(1):233-41.
- 118- Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med.* 2007; 20(2):139-43.
- 119- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene.* 2003; 22(13):2021-33.

- 120- Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K, Naess O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology*. 2005; 16(4):193-8.
- 121- Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ. Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*. 2008; 53(1):48-55.
- 122- Martin TA, Harrison GM, Watkins G, Jiang WG. Claudin-16 reduces the aggressive behavior of human breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2008; 105(1):41-52.
- 123- Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem*. 1997; 272:26652-8.
- 124- Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*. 2001; 61:7878-81.
- 125- Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology*. 2001; 121:678-84.
- 126- Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*. 2004; 164:1627-33.
- 127- Santin AD, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S. Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cancer Res*. 2005; 65:4334-42.
- 128- McCall RB. *Fundamental Statistics for Psychology*. New York: Harcourt, Brace & World; 1970.
- 129- Sigel S. *Estatística Não-paramétrica para as ciências do comportamento*. 3a. ed. São Paulo: McGraw-Hill; 1979.
- 130- Rosner B. *Fundamental of Biostatistics*. 4a. ed. New York; 1994.
- 131- Sobel G, Németh J, Kiss A, Lotz G, Szabó I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Páska C. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006; 103:591-8.

- 132- Szabó I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol.* 2009; 24:1607-15.
- 133- Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(7):2567-75.
- 134- Konecny GE, Agarwal R, Keeney GA, Winterhoff B, Jones MB, Mariani A, Riehle D, Neuper C, Dowdy SC, Wang HJ, Morin PJ, Podratz KC. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2008 ; 109(2):263-9.
- 135- Gaetje R, Holtrich U, Engels K, Kissler S, Rody A, Karn T, Kaufmann M. Differential expression of claudins in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2008; 24(8):442-9.
- 136- Pan XY, Li X, Weng ZP, Wang B. Altered expression of claudin-3 and claudin-4 in ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2009; 91(5):1692-9.
- 137- Huang Y, Bao Y, Peng W, Goldberg M, Love K, Bumcrot DA, Cole G, Langer R, Anderson DG, Sawicki JA. Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:3426-30.
- 138- Yuan X, Lin X, Monorek G, Kanatani I, Cheung LH, Rosenblum MG, Howell SB. Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8(7):1906-15.
- 139- Chiba T, Kawachi H, Kumagai J, Kitagaki K, Sekine M, Uchida K, Kobayashi M, Sugihara K, Eishi Y. Independent histological risk factors for lymph node metastasis of superficial esophageal squamous cell carcinoma; implication of claudin-5 immunohistochemistry for expanding the indications of endoscopic resection. *Dis Esophagus.* In press 2009.
- 140- Sakaguchi T, Suzuki S, Higashi H, Inaba K, Nakamura S, Baba S, Kato T, Konno H. Expression of tight junction protein claudin-5 in tumor vessels and sinusoidal endothelium in patients with hepatocellular carcinoma. *J Surg Res.* 2008; 147(1):123-31.
- 141- Soini Y, Talvensaaari-Mattila A. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 in ovarians tumors of diverse types. *Int J Gynecol Pathol.* 2006; 25(4):330-5.

- 142- Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol.* 2004; 35(12):1531-6.
- 143- Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pereira CM, Carvalho AL, Kowalski LP, Soares FA. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. *J Clin Pathol.* 2010; 57(2):304-16.
- 144- Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, de Carvalho AC, Lessa RC, Pereira CM, Vettore AL, Carvalho AL, Fregnani JH, Kowalski LP, Soares FA. Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010;57(5):689-98.
- 145- Agarwal R, Mori Y, Cheng Y, Jin Z, Olaru AV, Hamilton JP, David S, Selaru FM, Yang J, Abraham JM, Montgomery E, Morin PJ, Meltzer SJ. Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cells. *PLoS One.* 2009; 4(11):e8002.