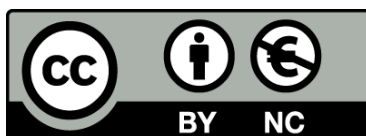




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Carcinoma de pene y vulva: diferencias etiopatogénicas entre Europa y África sub-Sahariana

Carolina Manzotti



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Carcinoma de pene y vulva: diferencias etiopatogénicas entre Europa y África sub-Sahariana

Memoria de tesis doctoral presentada por Carolina Manzotti para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Dirigida por:

Natalia Rakislova

Jaume Ordi Majà

Universitat de Barcelona / Hospital Clínic de Barcelona / Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal)

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat de Barcelona
Barcelona, junio de 2024

Agradecimientos

Quiero agradecer antes que a nadie a mi tutor y directores de tesis, Jaume Ordi y Natalia Rakislova, sin vosotros y vuestras ganas, nada de todo esto hubiera sido posible. Gracias por no dejar de empujarme hacia adelante y ayudarme a sacar este proyecto adelante a pesar de las trabas y dificultades en el camino.

A Adriana García que, sin estar directamente implicada en el contenido de la tesis, fue quien me permitió entrar en contacto con Jaume y con el equipo de profesionales con el que finalmente trabajé en este proyecto. A ti te debo además muchísimo más.

A todo el equipo de anatomía patológica del Hospital Clínic, médicos y técnicos, con quienes compartí parte del recorrido que condujo a la realización de esta tesis y de los que he aprendido infinidad de cosas, además de quedarme con amistades y valores entrañables. En particular a Lorena Marimon, siempre dispuesta a echarme la mano y a colaborar en lo que hiciera falta.

Gracias a tantos colegas que han colaborado y colaboran en este proyecto, que es mucho mayor que esta tesis, tanto aquí como en Mozambique.

A mis padres por haberme inculcado desde pequeña el amor al trabajo y el espíritu de superación personal. A mis hermanos con quienes, a base de competencia sana, aprendimos a querer siempre más y mejor.

Y finalmente, a los mayores estímulos que tengo para mejorar, crecer y seguir adelante, los cuatro hombres de mi vida, Nes, Max, Alex y Noah. Gracias por vuestra paciencia y por comprender y aceptar el tiempo que os he robado. Sois lo que me da fuerza y ganas cada día. Por y para vosotros.

A Max, Alex, Noah y Nes.

A mi familia.

FINANCIACIÓN

Los artículos que componen esta tesis han sido parcialmente financiados con fondos del Instituto de Salud Carlos III (Proyecto PI17/00772) y de la Unión Europea (ERDFI) (“A way to make Europe”).

Índice

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	13
LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	15
ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	19
1. Carcinoma de pene.....	21
1.1. Aspectos generales.....	21
1.2. Carcinoma escamoso de pene asociado e independiente del VPH.....	22
1.3. Lesiones precursoras del carcinoma de pene.....	23
1.4. Alteraciones genómicas en el carcinoma de pene y sus lesiones precursoras....	25
1.5. Presentación clínica, tratamiento y pronóstico del cáncer escamoso de pene...	26
2. Carcinoma escamoso vulva.....	33
2.1. Aspectos generales.....	33
2.2. Carcinoma escamoso de vulva asociado e independiente del VPH.....	35
2.3. Lesiones precursoras de carcinoma escamoso de vulva.....	37
2.4. Clasificación del carcinoma escamoso de vulva y sus precursores: determinación del VPH y estudio inmunohistoquímico.....	40

2.5. Alteraciones genómicas en el carcinoma escamoso de vulva y sus precursores.	42
2.6. Presentación de las lesiones precursoras de carcinoma escamoso de vulva.....	43
2.7. Clínica, manejo y pronóstico del carcinoma escamoso de vulva.....	44
HIPÓTESIS.....	51
OBJETIVOS.....	55
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.....	59
Artículo número 1. Penile Squamous Cell Carcinoma in Sub-Saharan Africa and Europe: Differential Etiopathogenesis.	63
Artículo número 2. Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe.	77
DISCUSIÓN.....	87
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105

Índice de tablas y figuras

Figura 1: Incidencia mundial del carcinoma de pene.....	21
Tabla 1: Estadiaje TNM de los carcinomas del pene (AJCC 8th ed, 2017).....	30
Figura 2: Incidencia mundial del carcinoma de vulva.....	33
Tabla 2: Clasificación de la FIGO 2021 para el carcinoma de vulva.....	46

Listado de abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

dPeIN: Neoplasia intraepitelial del pene de tipo diferenciado (por sus siglas en inglés, *differentiated penile intraepithelial neoplasia*).

dVIN: Neoplasia vulvar intraepitelial de tipo diferenciado (por sus siglas en inglés, *differentiated vulvar intraepithelial neoplasia*).

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

HSIL: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (por sus siglas en inglés, *high grade squamous intraepithelial lesion*).

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (por sus siglas en inglés, *International Agency for Research on Cancer*).

ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica (por sus siglas en inglés, *International Society of Urological Pathology*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAAF: Punción por aguja fina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*).

PeIN: Neoplasia intraepitelial del pene (por sus siglas en inglés, *penile intraepithelial neoplasia*).

PET: Tomografía por emisión de positrones (por sus siglas en inglés, *positron emission tomography*).

PSCC: Carcinoma escamoso del pene (por sus siglas en inglés, *penile squamous cell carcinoma*).

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

TAC: Tomografía computarizada.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPH: Virus del papiloma humano.

VSCC: Carcinoma escamoso de la vulva (por sus siglas en inglés, *vulvar squamous cell carcinoma*).

Tesis en formato de compendio de publicaciones

Enumeración de los artículos de la tesis

La tesis doctoral que se presenta consta de 9 objetivos y de 2 artículos de investigación original que se enumeran a continuación

Artículo número 1

Autores: Manzotti C, Chulo L, López Del Campo R, Trias I, Del Pino M, Saúde O, Basílio I, Tchamo N, Lovane L, Lorenzoni C, Fernandes F, Saco A, Rodrigo-Calvo MT, Marimon L, Ismail MR, Carrilho C, Ribera-Cortada I, Ordi J, Rakislova N.

Título: Penile Squamous Cell Carcinomas in Sub-Saharan Africa and Europe: Differential Etiopathogenesis.

Revista: Cancers (Basel). 2022 Oct 27;14(21):5284. doi: 10.3390/cancers14215284. PMID: 36358704; PMCID: PMC9654935.

Factor de impacto: 5,200 **Cuartil, área:** Q2 Oncología (72/241)

Artículo número 2

Autores: Rakislova N, Carreras-Dieguez N, Manzotti C, Saúde O, Del Pino M, Chulo L, Rangeiro R, Lovane L, Lorenzoni C, Fernandes F, Rodrigo-Calvo MT, Diaz-Mercedes S, Ribera-Cortada I, Sanfeliu E, Del Campo RL, Marimon L, Alós S, Vega N, Pérez FM, Trias I, Carrilho C, Ordi J.

Título: Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe.

Revista: Int J Cancer. 2023 Feb 1;152(3):496-503. doi: 10.1002/ijc.34314. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36214794.

Factor de impacto: 6,400 **Cuartil, área:** Q1 Oncología (49/318)

Introducción

1. Carcinoma escamoso de pene

1.1. Aspectos generales

El carcinoma escamoso de pene (PSSC por sus siglas en inglés, *penile squamous cell carcinoma*) representa más del 95% de las neoplasias del pene, correspondiendo el resto a neoplasias muy poco frecuentes en esta localización como melanoma, sarcomas, enfermedad de Paget extramamario y otros carcinomas como el adenoescamoso, mucoepidermoide o adenocarcinoma, entre otros [1].

En Europa y los países de renta alta el carcinoma escamoso de pene constituye aproximadamente el 0.5% de las neoplasias malignas en el hombre y presenta una gran variabilidad geográfica con incidencias que oscilan entre 0.5 y 1.6/100.000 habitantes [2]. En cambio, en algunas regiones de África, Asia y Sud América la incidencia es mucho mayor, pudiendo llegar incluso a constituir hasta el 10% de las neoplasias de los hombres.

En la Figura 1 se muestra la incidencia mundial del carcinoma de pene.

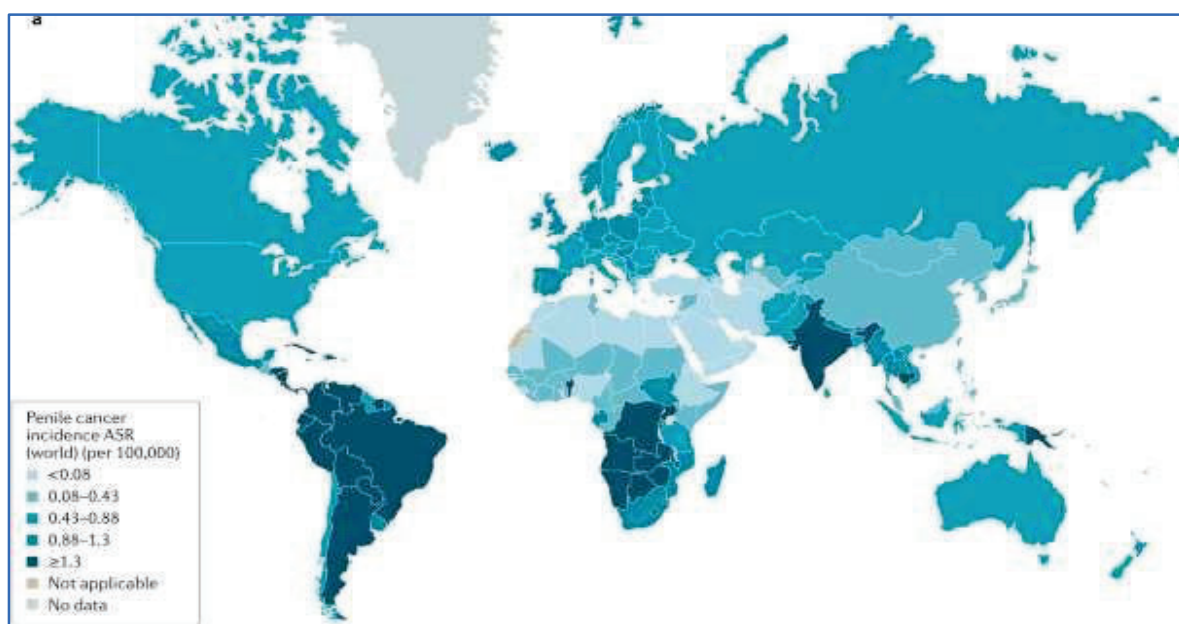


Figura 1. Incidencia mundial del carcinoma de pene (3).

Este tumor afecta especialmente a hombres de entre 50 y 70 años. Las localizaciones más frecuentes son las superficies mucosas del pene con especial incidencia en el glande, seguido de la mucosa del prepucio y del surco balano-prepucial. El origen cutáneo, en el cuerpo del pene, es la localización más infrecuente [1].

1.2. Carcinoma escamoso de pene asociado e independiente del virus del papiloma humano

De acuerdo con la literatura, los principales factores de riesgo relacionados con los carcinomas escamosos de pene son la ausencia de circuncisión en la primera infancia, unos hábitos higiénicos genitales deficientes, la fimosis, cuadros de inflamación crónica como el liquen escleroso o el liquen simple crónico, el tabaquismo, la inmunosupresión y el antecedente de infección por el virus papiloma humano (VPH) [1,3]. Este último factor reviste especial interés dado que se considera que alrededor de una tercera parte de los carcinomas escamosos de pene se relacionan con la presencia de este virus [4], un porcentaje similar a lo que ocurre en los carcinomas escamosos de la vulva y de la cabeza y el cuello [5,6]. Por estos motivos la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda clasificar los carcinomas escamosos de pene en función de la presencia o ausencia de VPH además de catalogarlos según el tipo histológico [1,7]. Así se ha descrito que las variantes basaloides, condilomatosas (*warty*), los carcinomas de células claras y los linfoepitelioma-like son más frecuentemente VPH-positivos, mientras que los subtipos como el usual (incluyendo el pseudohiperplásico, pseudoglandular y acantolítico), el verrucoso (incluyendo el cuniculatum), el papilar y el sarcomatoide, suelen ser independientes de la infección por VPH [8], aunque no hay una correlación exacta. Por este motivo se aconseja el uso de alguna técnica que determine la existencia de VPH en todos los carcinomas escamosos de pene. En este sentido la sobreexpresión de p16 detectada con técnicas

inmunohistoquímicas es un método aceptado como marcador subrogado de la presencia de VPH de alto riesgo puesto que su concordancia con la infección de estos virus alcanza el 84% [2]. Dada la elevada especificidad y sensibilidad de la p16, la *International Society of Urological Pathology* (ISUP) y la OMS recomiendan su uso en la clasificación de los carcinomas escamosos de pene. Además, la tinción para p53 se muestra frecuentemente sobreexpresada en los carcinomas escamosos de pene VPH-independientes, mientras que la tinción para p16 suele ser negativa [9] con lo que el uso de los dos marcadores podría ayudar a categorizar los carcinomas escamosos de pene de manera más objetiva en la rutina diaria.

1.3. Lesiones precursoras del carcinoma escamoso de pene

Igual que ocurre en la vulva, en el pene existen lesiones precursoras consideradas neoplasias intraepiteliales (PeIN por sus siglas en inglés, *penile intraepithelial neoplasia*) que también se clasifican en función de su relación con el VPH.

Se define como PeIN de tipo diferenciado (dPeIN por sus siglas en inglés, *differentiated penile intraepithelial neoplasia*) a las lesiones precursoras independientes de VPH, frecuentemente asociadas a un carcinoma escamoso invasor ya presente al momento del diagnóstico. Microscópicamente el dPeIN se caracteriza por un epitelio acantósico e hiperplásico con hiperortoqueratosis y paraqueratosis, acompañado de elongación y conexión de las crestas interpapilares creando una arquitectura epitelial reticulada. A bajo aumento, hay una impresión de epitelio que conserva la maduración con hipergranulosis y células atípicas hipercromáticas limitadas a las capas basal y parabasal. Sin embargo, a mayor aumento se pueden observar queratinocitos atípicos con abundante citoplasma eosinófilo, núcleo vesicular y ocasionales nucléolos prominentes. Asimismo, es posible identificar perlas córneas intraepiteliales y espongirosis y, en hasta un tercio de los casos,

puede haber atipia franca con pleomorfismo [10,11]. La atipia coilocítica está generalmente ausente y es posible observar cambios de liquen escleroso concomitante [10,12]. El dPeIN puede ser difícil de distinguir de condiciones reactivas como hiperplasia escamosa, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, liquen simple crónico y liquen escleroso y atrófico con epitelio hiperplásico y no existe ningún biomarcador fiable para confirmar el diagnóstico [13]. Aunque los índices de progresión de dPeIN a carcinoma invasor son desconocidos [14], se ha descrito que entre un 2 y un 8% de los casos de dPeIN relacionados con liquen escleroso y atrófico, pueden progresar a carcinoma invasor con un periodo de latencia de 12 a 17 años [15–18].

Los PeIN asociados a VPH, al igual que sucede con el dPeIN, se pueden encontrar tanto en proximidad a un carcinoma escamoso infiltrante como de forma aislada. Histológicamente, los PeIN relacionados con VPH se caracterizan por la presencia de atipia intraepitelial evidente con membrana basal conservada y muestran diferentes patrones histológicos, incluidos el subtipo basaloide (indiferenciado) y el condilomatoso (bowenoide o *warty*) entre los más frecuentes. El PeIN basaloide, que es el más frecuente en Europa [19], muestra un epitelio monótono con células pequeñas e inmaduras (aspecto basaloide), alto ratio núcleo- citoplasma, frecuentes figuras de apoptosis y numerosas mitosis. Por su parte el PeIN condilomatoso (bowenoide o *warty*) adopta una configuración papilomatosa con un epitelio constituido por células pleomórficas con atipia coilocítica, citoplasma algo más abundante y numerosas figuras de mitosis. Ambos subtipos se relacionan sobre todo con las cepas 16 y 18 del VPH. Con frecuencia existen formas mixtas, basaloide-condilomatosas, que combinan características basaloides en la base de la lesión y células más diferenciadas con características condilomatosas y atipia coilocítica en los estratos más superficiales [8].

Cuando el PeIN se presenta adyacente a un carcinoma invasivo ambas lesiones suelen presentar características similares: el PeIN diferenciado se localiza más habitualmente en el prepucio y asociado a un carcinoma escamoso queratinizante y en cambio los subtipos

de PeIN condilomatoso o basaloide se ubican más frecuentemente en el glande y en relación con carcinomas condilomatosos, basaloides o mixtos basaloide-condilomatosos [10].

1.4. Alteraciones genómicas en el carcinoma escamoso de pene y sus lesiones precursoras

Dado que la clasificación de las neoplasias de pene y sus lesiones precursoras se hace en función de su relación con el VPH debido a su correlación pronóstica, cabe esperar que la patogénesis molecular de ambas entidades sea distinta [20–22].

En el carcinoma escamoso de pene asociado al VPH, la infección epitelial persistente conlleva la integración del ADN vírico en el genoma de la célula huésped. Con las cepas de VPH de alto riesgo esta integración da como resultado una inestabilidad genómica con sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 que ejercen un efecto desregulador sobre el control del ciclo celular. La oncoproteína E7 del VPH de alto riesgo se une e inactiva la proteína de retinoblastoma (pRB) y da como resultado una progresión incontrolada del ciclo celular [20–22]. Este proceso conduce a la sobreexpresión de p16, debido a la interrupción del ciclo de retroalimentación negativa entre p16 y pRB [23]. Esto permite que la sobreexpresión de p16 se utilice como marcador de infección activa por VPH. La oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo se dirige a la proteína supresora de tumores p53. La unión de E6 a p53 provoca la supresión de la función inhibidora normal de p53 en la primera fase de síntesis del ADN (G1/S) del ciclo celular, lo que provoca una proliferación celular descontrolada, pérdida de diferenciación celular y disminución del control apoptótico [21].

En el caso de los tumores VPH-independientes existen grandes lagunas en el conocimiento de las vías oncogénicas. Se sabe que la ciclooxygenasa-2 (mediador clave en procesos

inflamatorios) se encuentra sobreexpresada en el PeIN, en el carcinoma invasor y en las metástasis ganglionares de estos tumores [24]. Esta sobreexpresión se relaciona con la activación de múltiples vías relacionadas con la invasión y la angiogénesis, una de las cuales PI3K-AKT. Por otra parte, se han identificado muchas alteraciones somáticas como pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*), mutaciones, deleciones, alteraciones de copias numéricas (*copy number alterations*) y modificaciones epigenéticas implicadas en distintas vías moleculares [2,20]. También se han descrito expresiones aberrantes de microARN con implicaciones en distintas vías carcinogénicas como MAPK, PI3K-AKT y p53. Recientemente estudios de secuenciación masiva con *whole exome sequencing* [25] han demostrado que una de las mutaciones más prevalentes en el carcinoma escamoso de pene es la de TP53, seguida de CSN1, así como NOTCH-1 y PIK3CA [26]. Se han descrito distintos tipos de mutaciones del gen TP53 (hasta 32 mutaciones somáticas diferentes en una serie) [20,26], y todas ellas acaban inactivando p53, con lo que se produce una sobreexpresión que puede ser detectada con técnicas inmunohistoquímicas.

En conjunto, parece que la vía oncogénica de los carcinomas escamosos de pene asociados a VPH está más estudiada y es diferente de los VPH- independientes y que, en estos últimos, las mutaciones de TP53 son más frecuentes, aunque no es la única vía molecular implicada.

1.5. Presentación clínica, tratamiento y pronóstico del carcinoma escamoso de pene

Los pacientes con cáncer de pene se suelen presentar con alteraciones cutáneas o con lesiones palpables, muchas veces indoloras, que en la inmensa mayoría de los casos se encuentran en el glande, surco balano-prepucial o en el prepucio y con menor frecuencia en el cuerpo del pene. En la valoración clínica inicial es esencial la evaluación de la zona inguinal para descartar la presencia de adenopatías patológicas, que se detectan

clínicamente en alrededor del 50% de los casos al momento del diagnóstico [27].

El diagnóstico del cáncer de pene requiere la toma de biopsias para la confirmación histológica del tumor y la estratificación del riesgo de acuerdo con las características microscópicas de la lesión. Los factores histológicos más importantes por su valor pronóstico son la profundidad de la invasión, el grado tumoral y la invasión linfovascular o perineural. El informe histopatológico debería incluir las distintas características tumorales como son: el tipo de muestra remitida (biopsia, circuncisión, penectomía parcial o total), la ubicación del tumor primario (glande, surco coronal, prepucio o piel del cuerpo del pene), tamaño tumoral, subtipo y grado histológico (incluyendo G1, G2 y G3 para tumores bien, moderadamente o pobremente diferenciados, respectivamente), espesor del tumor en profundidad, nivel de invasión (lámina propia, cuerpo esponjoso, cuerpo cavernoso) y la presencia o ausencia de invasión perineural y/o linfovascular. Así mismo se debería incluir en el informe si se identifica la presencia de lesiones asociadas como PeIN o liquen escleroso. Si se realiza estudio inmunohistoquímico para p16 como marcador subrogado de infección por VPH o estudio del ADN de VPH debería también incluirse el resultado en el informe. Si se hubieran remitido ganglios linfáticos para su estudio histológico se debe informar el sitio de la extirpación, número total de ganglios linfáticos identificados y número de ganglios positivos, así como la presencia de extensión extracapsular en caso de haberla [3,27].

El pronóstico del carcinoma escamoso de pene depende del grado y estadio en el momento del diagnóstico. Así, los casos diagnosticados en estadios precoces pueden ser controlados quirúrgicamente. Sin embargo, en estadios más avanzados el comportamiento puede ser muy agresivo y requieren terapias multimodales [28]. Los datos morfológicos actualmente implicados en el pronóstico son el tipo de crecimiento invasor (invación superficial versus vertical), subtipo histológico, grado, nivel de invasión, presencia o no de invasión perineural o vascular, estado de los márgenes de resección y, sobre todo, el estadio. En

este sentido la presencia de metástasis ganglionares es el dato clínico-patológico de mayor peso para el pronóstico del paciente [29]. Hoy en día no existen diferencias en el manejo clínico en relación a la presencia o ausencia del VPH, aunque los pacientes con carcinoma escamoso de pene relacionados con VPH parecen tener un mejor pronóstico. Tampoco existen actualmente biomarcadores con utilidad diagnóstica, pronóstica y/o terapéutica en el carcinoma escamoso de pene.

Una vez confirmado el diagnóstico se debe realizar el estudio de extensión basándose en los hallazgos clínicos y patológicos y realizando pruebas de imagen y biopsias quirúrgicas de ganglios linfáticos en casos seleccionados.

La clasificación TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), cuya 8ª edición fue actualizada en el 2017, es la más utilizada para el estadiaje tumoral. Esta estadificación permite establecer pronósticos y planificar estrategias terapéuticas según el riesgo (Tabla 1) [30–32].

La evaluación de metástasis a distancia se expresa como cM0 y cM1 para sospecha clínica de ausencia o presencia de éstas, respectivamente, y como pM1 si se confirma histológicamente la presencia de metástasis a distancia [30–32].

La afectación de ganglios linfáticos es el principal predictor de supervivencia, con tasas de supervivencia libres de enfermedad para los pacientes con estadio pN0, pN1, pN2 y pN3 de 96%, 80%, 66%, and 37% respectivamente [27].

Debido a la tendencia de los carcinomas escamosos del pene a dar metástasis tempranas en los ganglios linfáticos regionales (inguinales y pélvicos), su diagnóstico y tratamiento son críticos para el pronóstico. La valoración inicial de las adenopatías regionales se suele limitar a la exploración física ya que la resolución de las pruebas de imagen como tomografía computarizada (TAC), resonancia magnética (RMN) o tomografía por emisión de positrones (PET/TAC) no permiten detectar lesiones de menos de 2mm, pasando entonces por alto las micrometástasis. El estudio ecográfico inicial solo sería recomendable

en aquellos pacientes en los cuales la exploración física puede ser dificultosa, como en el caso de hombres obesos o que ya hayan pasado por cirugías o lesiones inguinales que modifiquen la anatomía [3,27,33].

En aquellos pacientes en los que no se palpan adenopatías inguinales patológicas pero que presentan tumores primarios con alto riesgo de desarrollar metástasis ganglionares se recomienda la evaluación quirúrgica de los ganglios linfáticos mediante biopsia dinámica del ganglio centinela (*Dynamic sentinel node biopsy*, DSNB por sus siglas en inglés) o mediante la disección superficial de ganglios linfáticos inguinales. Estas técnicas son menos agresivas que la linfadenectomía inguinal tradicional y presentan menor tasa de complicaciones y de efectos secundarios a largo término. Se consideran grupo de alto riesgo de desarrollar metástasis ganglionares los tumores T2 o mayores, los que presentan alto grado histológico y/o invasión linfovascular o perineural. En estos casos, si tras el estudio histológico no se identifican metástasis ganglionares se recomienda realizar seguimiento activo. Por el contrario, si se detecta metástasis en algún ganglio sin extensión extranodal se debe realizarla linfadenectomía inguinal ipsilateral completa y linfadenectomía ipsilateral terapéutica con linfadenectomía pélvica uni o bilateral si se identifican 2 o más ganglios metastásicos o al menos uno con extensión extranodal [27,33].

En los casos en los que clínicamente se palpan adenopatías se deben realizar pruebas de imagen como TAC, RMN o PET-TAC para evaluar la extensión de la enfermedad, así como punción por aguja fina (PAAF) de la adenopatía para su estudio patológico. Si la PAAF resulta positiva se recomienda el tratamiento quirúrgico, si por el contrario resulta negativa y el riesgo de metástasis es bajo se aconseja realizar biopsia excisional para estudio definitivo del ganglio. En el caso de PAAF negativa y alto riesgo de metástasis lo aconsejable sería realizar el estudio del ganglio por linfadenectomía inguinal superficial o modificada [3,27,33].

Tabla 1: Estadiaje TNM de los carcinomas del pene.**Tumor primario (pT)**

pT0	Sin evidencia de tumor primario
pTis	Carcinoma in situ, equivalente al PeIN
pTa	Carcinoma escamoso localizado no invasivo
pT1	Glande: tumor que invade la lámina propia Prepucio: tumor con invasión de la dermis, la lámina propia o el dartos Cuerpo: tumor con invasión del tejido conectivo entre la epidermis y los cuerpos cavernosos o esponjoso pT1a Ausencia de invasión linfovascular, perineural o alto grado histológico pT1b Presencia de invasión linfovascular, perineural o alto grado histológico
pT2	Tumor que invade el cuerpo esponjoso, con o sin invasión uretral
pT3	Tumor que invade el cuerpo cavernoso, con o sin invasión uretral
pT4	Tumor que invade estructuras adyacentes (por ejemplo, escroto, próstata o hueso púbico)

Ganglio linfático (N)

cN0	Ausencia de ganglios aumentados de tamaño
pN0	Ausencia de metástasis
cN1	Un ganglio unilateral móvil palpable
pN1	≤2 metástasis ganglionares unilaterales sin extensión extranodal
cN2	≥ 2 ganglios unilaterales móviles palpables o nódulos bilaterales
pN2	≥3 metástasis unilaterales o metástasis bilaterales, sin extensión extranodal
cN3	Masa ganglionar fija palpable uni o bilateral o linfadenopatías pélvicas
pN3	Metástasis ganglionares con extensión extranodal o metástasis en ganglios linfáticos pélvicos

Adaptado de Sanchez DF et al. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 2022;40:215–22 (31).

En aquellos pacientes que clínicamente se presentan como estadio cN2 (linfadenopatías inguinales palpables móviles, múltiples o bilaterales) o cN3 (masas adenopáticas inguinales fijas o linfadenopatías pélvicas uni o bilaterales) también se realiza linfadenectomía pélvica, frecuentemente tras realizar quimioterapia neoadyuvante [3,27,33].

El uso de quimioterapia adyuvante luego de una linfadenectomía radical mejora la supervivencia específica [33,34].

El objetivo principal del tratamiento del tumor primario es una completa extirpación del tumor tratando de preservar el órgano todo lo que sea posible sin comprometer el posterior control oncológico.

Para tratar las lesiones superficiales no invasivas (PeIn, Ta) se puede optar por realizar circuncisión si están limitadas al prepucio o realizar una escisión local amplia o intervención de *resurfacing* parcial del glande. Se prefieren las intervenciones de resección en lugar de tratamientos tópicos o ablativos porque permiten realizar un estadiaje histopatológico correcto y descartar la existencia de focos de neoplasia infiltrantes. Si se opta por tratamiento no invasivo la terapia tópica con imiquimod o 5-fluorouracilo son una alternativa efectiva [33,35–37].

Los carcinomas invasivos localizados son tratados con intención curativa mediante diversas técnicas quirúrgicas, como escisión local amplia o resección parcial o total del glande con o sin reconstrucción de un neoglande. Para asegurar la extirpación completa del tumor con márgenes quirúrgicos histológicamente negativos la escisión debe incluir un margen de piel de aspecto clínicamente normal alrededor del tumor y del eritema periférico, pudiéndose en los casos dudosos, realizar una cirugía de Mohs para control de márgenes durante el acto quirúrgico [27,33,35,38]. Las recomendaciones actuales con respecto a los márgenes de resección han dejado obsoletos los 2cm que se exigían antiguamente, considerándose que las tasas de recurrencia local solo se incrementan de forma significativa cuando el margen quirúrgico es menor de 1mm [35,39].

Los tumores mayores con invasión del cuerpo cavernoso y esponjoso requerirán intervenciones mayores como amputación del glande o amputación parcial o radical del pene. Para los tumores no resecables, la inducción con quimioterapia permitiría disminuir el estadio de la enfermedad y facilitar la cirugía posterior en los pacientes respondedores y en aquellos que no responden, o en quienes no aceptan una cirugía extensa la (quimio-) radioterapia es una opción [35].

Los carcinomas de células escamosas son generalmente tumores radiosensibles y el uso de radioterapia como parte del tratamiento está indicada en carcinomas escamosos tanto de la región anogenital como de la región de cabeza y cuello. Sin embargo, el rol de la radioterapia en estos tumores en el pene se sigue debatiendo y las diferentes guías difieren entre sí, mientras que la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) apoya su uso como tratamiento definitivo [40], la European Association of Urology (EAU) solo la recomienda como tratamiento paliativo [35].

En aquellos pacientes que presentan metástasis a distancia, más frecuentemente afectando pulmones, hígado o cerebro, la utilización de quimioterapia paliativa puede conseguir beneficios limitados sobre la supervivencia [3,33]. Adicionalmente, la radioterapia puede ralentizar la progresión y se puede emplear para control de los síntomas locales o de las metástasis [3,35,40].

Para aquellos pacientes en los que fracasa la quimio-(radio)-terapia las opciones son reducidas y las nuevas terapias sistémicas como la inmunoterapia y las terapias dirigidas, de momento solo han demostrado un éxito limitado, si bien se las sigue estudiando en diversos ensayos clínicos en marcha [27,33,35,40,41].

2. Carcinoma escamoso de vulva

2.1. Aspectos generales

El carcinoma escamoso de vulva es una neoplasia genital poco común, con una incidencia global de 1.2 casos por 100.000 mujeres/año [42]. Típicamente se diagnostica en mujeres de edad avanzada, aunque en las últimas décadas se ha observado una mayor incidencia en mujeres jóvenes [43]. Además, con el aumento de la esperanza de vida, se prevé una mayor incidencia de esta neoplasia en los próximos años. El carcinoma escamoso es el tipo histológico más prevalente y representa el 90% de los tumores malignos de la vulva, siendo el segundo en frecuencia el melanoma [44,45].

En la Figura 2 se muestra la incidencia mundial del carcinoma de vulva.

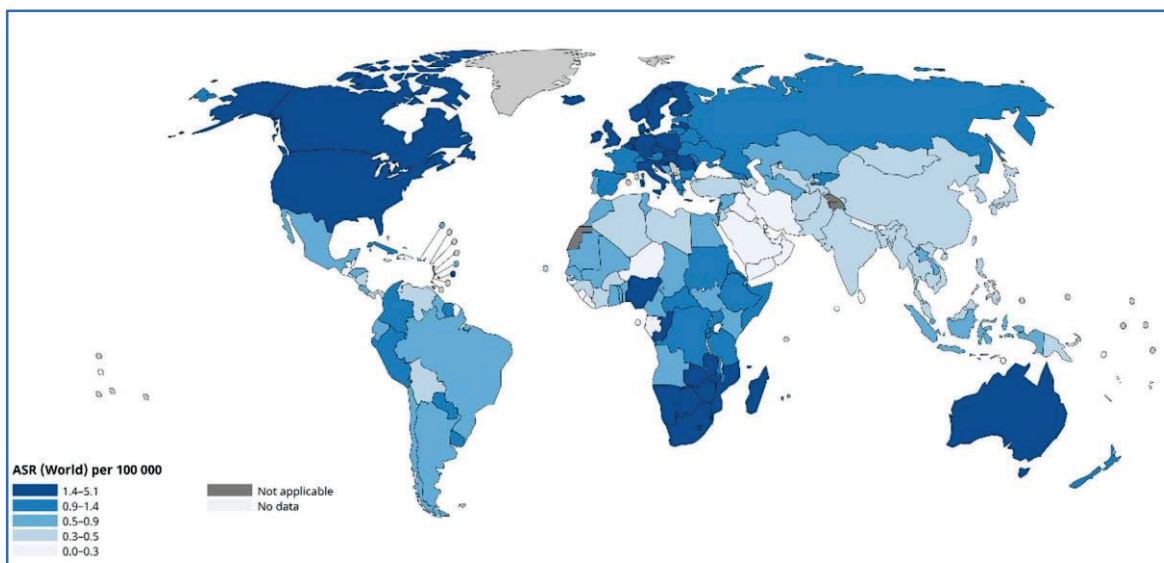


Figura 2. Incidencia mundial del carcinoma de vulva en 2022 [42].

El carcinoma escamoso de vulva ha sido clasificado clásicamente en diferentes variantes en base a las características histológicas de la neoplasia, destacando principalmente los subtipos basaloide, condilomatoso y el queratinizante. La OMS publicó en septiembre de 2022 una nueva clasificación de las neoplasias [44], basada en las dos vías de carcinogénesis claramente identificadas en estos tumores: una vía asociada al VPH y una vía independiente de este virus. En parte, el fundamento de esta nueva clasificación estriba en que, mientras la clasificación histológica no siempre se correlaciona con las características clínicas y el comportamiento del tumor, los tumores asociados al VPH y los independientes del mismo sí que han mostrado características clínicas e historia natural claramente diferentes entre sí. El carcinoma escamoso de vulva suele ir precedido durante un período de tiempo variable por una lesión intraepitelial premaligna, que se considera precursora del carcinoma invasivo. Dependiendo de si los tumores están asociados o no al VPH se asocian a un tipo particular de lesión precursora diferente.

Desafortunadamente, aún existen muchos aspectos poco conocidos de la historia natural del carcinoma escamoso de vulva y sus lesiones precursoras, particularmente de los tumores VPH-independientes. Gran parte de este desconocimiento se debe a la baja incidencia de estos tumores y a las limitaciones inherentes a la clasificación clásica del carcinoma escamoso de vulva. Además, las lesiones precursoras del carcinoma escamoso de vulva VPH-independiente son difíciles de caracterizar tanto clínica como histológicamente. Actualmente, tal y como ocurre con el carcinoma de células escamosas del pene, la conducta clínica y el tratamiento del carcinoma escamoso de la vulva es homogéneo, independientemente de su asociación o no al VPH o de su tipo histológico específico [46,47]. Además, prácticamente no existe disponibilidad de terapias dirigidas específicas para el carcinoma escamoso de vulva [46,47], y hay un número muy limitado de ensayos clínicos publicados en este campo [48,49].

2.2. Carcinoma escamoso de vulva asociado e independiente del virus del papiloma humano

La prevalencia de VPH como agente etiopatogénico del carcinoma escamoso de vulva varía entre el 9% y el 100% en las diferentes series publicadas [50–53]. El mayor estudio internacional acerca de la implicación de VPH en el carcinoma escamoso de vulva describe una prevalencia del 25% entre los 1709 casos de carcinoma escamoso de vulva evaluados [51]. En Europa, América del Norte y Oceanía, la mayoría de los carcinomas escamosos de la vulva se desarrollan a través de la vía independiente de VPH. Datos de nuestro grupo indican que menos del 20% de los carcinomas escamosos de vulva tratados en el Hospital Clínic de Barcelona están asociados al VPH [54]. En cambio, en otros países en vías de desarrollo en los que existe además una elevada prevalencia global de infección por VPH, los carcinomas escamosos de vulva predominantes son aquellos asociados al virus [51,52]. Además de las variaciones en la prevalencia de la infección por VPH en las distintas regiones geográficas, otro factor responsable de esta variabilidad entre la proporción de carcinomas escamosos de vulva asociados e independientes del VPH es el uso de diferentes técnicas de detección del virus, su precisión diagnóstica, o la posibilidad de contaminación de las muestras, que pueden resultar en una subestimación o sobreestimación del papel etiopatogénico del VPH [53].

Desde el punto de vista histológico, los carcinomas escamosos de vulva asociados al VPH se han caracterizado tradicionalmente como basaloideos o condilomatosos, mientras que los tumores independientes de VPH se han caracterizado como queratinizantes [55,56]. Los tumores de tipo basaloide presentan células pequeñas, basaloideas, con escaso citoplasma y poca queratinización; mientras que los de tipo condilomatoso suelen presentar una apariencia condilomatosa y cambios coilocíticos [53]. Los tumores queratinizantes se conforman por células diferenciadas en ausencia de coilocitosis y frecuentemente muestran perlas de queratina [53]. La anterior clasificación de la OMS del

carcinoma escamoso de vulva [57] basada en los tres tipos histológicos principales (basaloide, condilomatoso y queratinizante) se veía limitada por una cierta superposición entre algunas de las características histológicas de estos subtipos, por lo que la clasificación de estas lesiones no siempre era clara. Además, se ha descrito también una considerable superposición entre los tipos histológicos y su relación con el VPH: se ha visto que aproximadamente un tercio de los tumores asociados al VPH son queratinizantes, mientras que una quinta parte de los carcinomas escamosos de vulva VPH-independientes muestran características histológicas basaloideas o condilomatosas [50,56]. En los últimos años, se ha demostrado que desde el punto de vista clínico y pronóstico es más relevante la asociación o no con el VPH que el tipo histológico de los tumores [58,59]. Los carcinomas escamosos de vulva asociados a VPH se presentan a edades más tempranas que los independientes de VPH (59 versus 72 años) [58], y hay estudios que sugieren que tienen mejor pronóstico que los tumores independientes de VPH [58]. Así pues, la nueva clasificación de la OMS se fundamenta en la caracterización etiopatogénica del carcinoma escamoso de vulva, estableciendo como prioridad el *status* VPH frente a la clasificación puramente morfológica.

En los últimos años, se ha propuesto una subclasificación de los tumores VPH-independientes en función de p53 (patrón mutado o *wild type*) [59–61]. Los tumores VPH-independientes p53 *wild type* tienen frecuentemente lesiones precursoras asociadas específicas, llamadas acantosis vulvar con diferenciación alterada (VAAD por sus siglas en inglés, *vulvar acantosis with altered differentiation*) [62] y lesión intraepitelial exofítica vulvar diferenciada (DEVIL por sus siglas en inglés, *differentiated exophytic vulvar intraepithelial lesion*) [49]. En cambio, los tumores con alteraciones en p53 son habitualmente de tipo queratinizante y su lesión precursora es frecuentemente una neoplasia intraepitelial vulvar de tipo diferenciado (dVIN por sus siglas en inglés, *differentiated vulvar intraepithelial neoplasia*). Hay estudios que demuestran que la tinción inmunohistoquímica para p53 tiene una buena correlación con el status del gen *TP53* [59–

61]: los patrones inmunohistoquímicos de tipo basal o sobreexpresión difusa corresponden a *TP53*-mutado, mientras que el patrón disperso (*scattered*) y el medio-epitelial corresponden a *TP53 wild type* [63,64]. Sin embargo, existe poca evidencia entre las diferencias clínicas y pronósticas de estos dos subtipos de tumores VPH-independientes [61].

2.3. Lesiones precursoras del carcinoma escamoso de vulva

Los distintos tipos etiopatogénicos de carcinoma escamoso de vulva (asociado a VPH o VPH-independiente) se asocian a lesiones intraepiteliales precursoras diferentes. La clasificación de las lesiones intraepiteliales asociadas a VPH se realiza mediante la terminología LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*) propuesta en 2012 y reconocida en la clasificación de la OMS 2020. Esta terminología unifica la nomenclatura utilizada para denominar las lesiones asociadas al VPH en todo el tracto anogenital [65]. De esta manera, las lesiones precursoras asociadas a VPH se denominan "lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado" (HSIL por sus siglas en inglés, *high grade squamous intraepithelial lesion*). El término HSIL vulvar reemplaza las antiguas denominaciones de uVIN (neoplasia vulvar intraepitelial de tipo usual) y VIN 2-3. Las lesiones HSIL se caracterizan por una marcada atipia citológica, ausencia de maduración celular que afecta a todo el espesor del epitelio, un elevado ratio núcleo-citoplasma con hipercromasia y presencia de mitosis en todo el grosor de la epidermis, que está engrosada y suele mostrar hiper- y/o paraqueratosis [66]. En este tipo de lesiones es relativamente frecuente la afectación de los anejos cutáneos [67]. Se han descrito dos variantes morfológicas de HSIL, una denominada basaloide y otra denominada condilomatosa. La variante basaloide muestra una marcada inmadurez de las células en todo el grosor del epitelio, con atipia citológica más prominente y marcados cambios coilocíticos. Por su parte, la variante condilomatosa se caracteriza por presentar crestas anchas y profundas

que resultan en una apariencia condilomatosa, con un marcado pleomorfismo, agrandamiento nuclear y figuras mitóticas atípicas, siendo fácilmente reconocibles los signos de la infección por VPH (coilocitosis, multinucleación, gránulos gruesos de cromatina). Sin embargo, muchas lesiones HSIL tienen características mixtas, con patrones que recuerdan a ambas variantes [53]. La asociación de estas lesiones con otras lesiones premalignas en distintas áreas del tracto anogenital, como el cuello uterino, ano o vagina es frecuente [68]. El riesgo de progresión a carcinoma invasivo a partir de las lesiones precursoras asociadas a VPH es relativamente bajo, entre el 9 y el 16% según las series en pacientes no tratadas [69,70], y alrededor del 3% en las pacientes tratadas [70].

Las lesiones precursoras independientes de VPH se denominan dVIN y se originan frecuentemente sobre piel vulvar previamente afecta por dermatosis inflamatorias crónicas (liquen escleroso, liquen plano u otras). Se caracterizan por presentar queratinocitos atípicos en un epitelio bien diferenciado, en el cual la atipia se limita a los estratos basales y parabasales y donde las células presentan un citoplasma amplio y forman las llamadas “perlas abortivas”. Las crestas papilares suelen mostrarse elongadas y ramificadas. A diferencia de las lesiones asociadas al VPH, la extensión a anejos cutáneos es poco habitual en este tipo de lesiones [71]. El reconocimiento histológico del dVIN resulta muchas veces complicado a causa del alto grado de diferenciación celular que muestran estas lesiones y de la dificultad que presentan para diferenciarlos de las lesiones inflamatorias. Como consecuencia de ello esta entidad es frecuentemente infradiagnosticada por la sutileza de sus características histológicas, que suponen un desafío para la mayoría de los patólogos [72]. La tasa de progresión de dVIN a carcinoma invasivo es más alta que la de las lesiones asociadas al VPH (32-41%) y el proceso de progresión es más rápido [53,71,73,74]. Si bien la mayoría de los carcinomas escamosos de la vulva en los países de renta alta son independientes de VPH, las lesiones dVIN de forma aislada son raramente diagnosticadas en la práctica asistencial, siendo más frecuente el

diagnóstico de estas lesiones en asociación con los carcinomas escamosos de vulva. Este hecho se explica, en parte, por la dificultad en su diagnóstico para los clínicos y los patólogos, y en parte por su rápida progresión desde lesión premaligna a carcinoma invasivo [72,75].

Igual que ocurre con el carcinoma escamoso invasivo de vulva, se ha descrito un cierto grado de solapamiento entre las características histológicas de las lesiones precursoras asociadas a VPH (HSIL) y las VPH-independientes (dVIN). Varios estudios muestran que una proporción pequeña de lesiones dVIN pueden tener características morfológicas de HSIL [76,77], y a la inversa, lesiones asociadas a VPH que pueden parecer histológicamente lesiones dVIN [78]. Un trabajo reciente describe que el 6% de tumores VPH-independientes surgen de una lesión precursora morfológicamente indistinguible de una lesión HSIL [76,79]. En semejanza al HSIL asociado a VPH, este precursor VPH independiente presenta una maduración celular anormal en todo el grosor del epitelio, con células de morfología basaloide y cambios coilocíticos. Estas lesiones han recibido el nombre de dVIN basaloide o lesiones HSIL-like [76,79]. A diferencia del HSIL asociado a VPH, estas lesiones no presentan positividad para p16 y son negativas para VPH de alto riesgo; en cambio, frecuentemente presentan alteraciones en p53, de forma similar al dVIN convencional. Estudios recientes han mostrado que los carcinomas invasores originados sobre estas lesiones de HSIL-like presentan un comportamiento más agresivo [80].

Las lesiones premalignas VPH-asociadas con características de dVIN son muy infrecuentes y escasamente descritas en la literatura. En 2018, en un estudio de nuestro grupo se identificaron lesiones con características dVIN o de liquen simple adyacentes a carcinoma escamoso de vulva asociado a VPH de forma concluyente; puesto que un resultado falso positivo en la determinación de VPH podría haber alterado de forma sustancial los resultados de este estudio, en dicho estudio se definió como tumor asociado a VPH de forma concluyente aquel que presentaba positividad para ADN y ARN de VPH de alto riesgo y positividad también para p16 [78].

De esta manera, en una proporción de pacientes con lesiones premalignas de vulva, los criterios puramente histológicos no son suficientes para un diagnóstico exacto, y por consiguiente algunos casos de dVIN con características HSIL-like pueden ser incorrectamente diagnosticados y/o, infratratados. A la inversa, las pacientes con HSIL vulvar y características de dVIN-like, probablemente sean tratadas de forma más agresiva de lo que sería necesario. Desafortunadamente, aún no hay estudios suficientes y se desconoce si estas lesiones con características histológicas inusuales y los carcinomas que se originan sobre ellas presentan distinto pronóstico y, por lo tanto, si debieran tratarse de forma diferente.

Las lesiones inflamatorias de la vulva (liquen escleroso, el liquen simple crónico y el liquen plano principalmente), a pesar de no mostrar signos de displasia, se consideran el sustrato para el desarrollo de los carcinomas escamosos de vulva VPH-independientes. Aunque su prevalencia es elevada en pacientes postmenopáusicas, su etiología y patogénesis es incierta y su potencial oncológico constituye un campo particularmente complejo y poco explorado [81]. Mientras que algunos autores reportan que una proporción significativa de estas lesiones inflamatorias pueden progresar a carcinoma escamoso de vulva [82], otros autores observan lo contrario [83].

2.4. Clasificación del carcinoma escamoso de vulva y sus precursores: determinación del virus del papiloma humano y estudio inmunohistoquímico

Dado que los criterios puramente histológicos carecen de precisión a la hora de distinguir los carcinomas y lesiones precursoras asociados o independientes del VPH, para realizar esta distinción se utilizan test moleculares que detectan secuencias de ADN del VPH, generalmente basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*). Las técnicas basadas en PCR tienen una sensibilidad muy alta, pero por el contrario la contaminación y la ubicuidad del VPH, son causa de

ocasionales resultados falsamente positivos. Además, dado que la detección de VPH en lesiones vulvares habitualmente se realiza en tejidos fijados en formol y parafinados, la fragmentación del ADN secundaria a la fijación del tejido puede causar falsos negativos [50].

Además de las pruebas moleculares de VPH, la detección de p16 mediante estudio inmunohistoquímico se ha usado como biomarcador subrogado de la infección por el virus [84]. La p16 es una proteína de las células humanas que se encuentra sobreexpresada de forma selectiva en células infectadas por VPH. Se ha propuesto que, para clasificar de manera concluyente un tumor como asociado a VPH, se requiere la detección de ADN de VPH y una tinción inmunohistoquímica positiva para p16, mientras que lo contrario (VPH negativo en pruebas moleculares y tinción inmunohistoquímica negativa para p16) sería el requisito para clasificar una lesión como independiente del virus. De hecho, en un estudio publicado por nuestro grupo, la mayoría de los carcinomas escamosos de la vulva se incluyeron en una de estas dos categorías [50].

Desafortunadamente, no existe un marcador subrogado para las lesiones VPH-independientes. Sin embargo, el carcinoma escamoso de la vulva VPH-independiente y las lesiones dVIN muestran a menudo un patrón de expresión anormal para p53 en el estudio inmunohistoquímico, lo que sugiere mutación en el gen *TP53*. Se considera expresión anormal tanto una marcada sobreexpresión de p53 como una ausencia completa de expresión de la proteína (expresión nula). Las alteraciones de p53 se presentan en aproximadamente dos tercios de los tumores VPH-independientes [85]. Por tanto, existe un tercio de los carcinomas escamosos de la vulva VPH-independientes que presentan una expresión normal de p53 (perfil inmunohistoquímico *wild-type*). Este subgrupo de carcinomas escamosos de vulva p16 y p53 negativos suele presentar un diagnóstico difícil y un comportamiento poco conocido. Por todo esto, la inmunohistoquímica para p53 presenta limitaciones importantes para diferenciar las lesiones premalignas VPH-independientes de otras lesiones inflamatorias benignas [86]. Así pues, son necesarios

estudios moleculares que identifiquen marcadores subrogados de las lesiones VPH-independientes, permitiendo un diagnóstico más exacto de estas lesiones.

2.5. Alteraciones genómicas en el carcinoma escamoso de vulva y sus lesiones precursoras

La vía carcinogénica del carcinoma escamoso de vulva asociado a VPH se conoce relativamente bien, dado que tiene muchos puntos en común con la carcinogénesis del cáncer de cuello de útero, que es el tumor por antonomasia asociado a VPH. Por el contrario, los mecanismos moleculares de los carcinomas escamosos de vulva VPH-independientes son, en gran parte, desconocidos. Dichos mecanismos parecen ser más complejos que los de la vía de carcinogénesis asociada a VPH [87]. Los pocos estudios moleculares publicados incluyen un número pequeño de casos y se centran en la evaluación de genes implicados en la carcinogénesis de los tumores de cabeza y cuello, mucho más prevalentes [61]. Extrapolar esta información a los carcinomas escamosos de vulva puede ser inexacto ya que se trata de tumores muy diferentes. Las mutaciones más frecuentemente reportadas en carcinoma escamoso de vulva incluyen *TP53*, *PTEN* y *CDKN2A*, independientemente del *status* VPH. Los pocos estudios que comparan los perfiles genómicos del carcinoma escamoso de vulva asociado e independiente de VPH presentan resultados discordantes. Algunos trabajos describen que los carcinomas escamosos de vulva VPH-independientes presentan más mutaciones que los asociados a VPH [88], mientras que otros encuentran una proporción similar de mutaciones en ambos grupos [61]. La mayoría de los estudios sugieren que las mutaciones identificadas con más frecuencia en el carcinoma escamoso de vulva independiente de VPH y sus lesiones precursoras son en *TP53*, seguidas por *NOTCH-1*, *PICK3CA*, y *HRAS* [89]. Diferentes estudios recientes concluyen que el carcinoma escamoso de vulva VPH-independiente con un perfil de *TP53* mutado se asocia a peor pronóstico que el carcinoma escamoso de vulva VPH-

independiente con perfil *TP53 wild type* [59,61,90].

En cuanto a las lesiones precursoras independientes de VPH, la mayoría de los estudios se han centrado en evaluar las mutaciones de *TP53*, con resultados variables. Los estudios moleculares más completos demostraron que al menos un tercio de las lesiones premalignas VPH-independientes presentan mutaciones en *TP53* [91]. Frecuentemente, se han observado mutaciones en los genes *NOTCH-1*, *HRAS* y *PICK3CA* [61,91]. No obstante, la principal limitación de estos estudios es que se han basado en paneles de genes evaluados en los carcinomas de cabeza y cuello. Son escasos los estudios que exploran los perfiles moleculares de las lesiones inflamatorias de la vulva asociadas a lesiones premalignas y carcinoma invasor [92].

2.6. Presentación de las lesiones precursoras de carcinoma escamoso de vulva

La presentación clínica de las lesiones premalignas de la vulva (dVIN y HSIL vulvar) es muy heterogénea. El 50% de las pacientes son asintomáticas realizándose el diagnóstico de forma incidental en un examen ginecológico rutinario, lo cual destaca la importancia de realizar una exploración vulvar sistemática. El síntoma más frecuente del dVIN y del HSIL es el prurito vulvar, seguido por el dolor, escozor, dispareunia o disuria [93,94].

Las lesiones HSIL presentan una apariencia macroscópica variable, suelen ser bien delimitadas, sobreelevadas o papilomatosas y muchas veces pigmentadas [53]. Clínicamente, las lesiones dVIN son más difíciles de reconocer, y se presentan en forma de placas blanquecinas mal definidas, típicamente menos voluminosas que las lesiones tipo HSIL [53]. Estas lesiones se suelen asociar a procesos dermatológicos inflamatorios, principalmente el liquen escleroso y el liquen simple crónico, y pueden tener manifestaciones clínicas como irritación local o dolor [53].

El diagnóstico definitivo de las lesiones premalignas de la vulva es histológico.

Habitualmente la toma de biopsia en estos casos se realiza en la consulta con anestesia local [95,96]. En el caso de las lesiones inflamatorias de la vulva, como el liquen plano o escleroso, no es necesario realizar confirmación diagnóstica histológica sistemática a menos que existan dudas diagnósticas, sospecha de lesión invasiva o preinvasiva, falta de respuesta al tratamiento tópico, o en caso de antecedente de patología maligna o premaligna vulvar o en otras áreas de tracto anogenital [95].

El tratamiento de las lesiones inflamatorias de la vulva (liquen plano y liquen escleroso) se realiza con la aplicación de corticoides tópicos de alta potencia. En los casos de liquen escleroso muy evolucionado con distorsión anatómica de los genitales externos y secuelas asociadas a la fibrosis y esclerosis, se puede plantear un tratamiento quirúrgico para restaurar la funcionalidad y anatomía del área genital. El tratamiento de segunda línea del liquen plano consiste en uso de corticoides sistémicos, antipalúdicos o fármacos inmunosupresores [97]. El tratamiento de elección de las lesiones dVIN es la exéresis, principalmente por el riesgo asociado de enfermedad microinvasiva oculta y el mayor riesgo de progresión a carcinoma invasor. El tratamiento de HSIL puede realizarse con procedimientos escisionales, o en caso de que se disponga de biopsias previas y bajo riesgo de invasión oculta, también puede realizarse con terapias destructivas (vaporización con láser CO₂) o tópicas (imiquimod, 5-fluorouracilo). Cabe destacar que, en general, estas lesiones presentan un elevado porcentaje de recurrencias y riesgo de progresión a lesiones invasivas, por lo que es esencial un seguimiento estrecho de las pacientes tratadas [95].

2.7. Presentación clínica, tratamiento y pronóstico del cáncer escamoso de vulva

El principal motivo de consulta de las pacientes con cáncer de vulva es la presencia de una lesión ulcerada en genitales externos, unifocal o multifocal, en ocasiones asociada a sangrado o a secreción serosa o purulenta. Es frecuente la historia previa de molestias o

prurito vulvar crónico [98]. En la exploración física es importante delimitar correctamente la extensión de la lesión, evaluando la posible afectación de la vagina, uretra o ano, así como la presencia y extensión de lesión premaligna adyacente [99]. En estas pacientes, es frecuente identificar la presencia de lesiones inflamatorias asociadas en la periferia de la lesión [82,99]. También es importante examinar el área inguinal para descartar la presencia de adenopatías patológicas. El diagnóstico de confirmación del cáncer de vulva es histológico, por lo que debe realizarse una biopsia con aplicación de anestésico local [99].

En las pacientes con cáncer de vulva, es necesario realizar un estudio de extensión mediante resonancia magnética, ecografía inguinal, y en casos seleccionados tomografía por emisión de positrones para evaluar la presencia de metástasis. En caso de objetivar en la exploración física o con las pruebas de imagen la existencia de ganglios linfáticos inguinales sospechosos debe realizarse una biopsia dirigida. Además, si existe sospecha clínica, radiológica o patológica de enfermedad ganglionar o a distancia, se recomienda realizar un TC toracoabdominal o PET/TC [46]. También se recomienda una exploración del cuello del útero, vagina y ano, especialmente en pacientes con patología asociada a VPH [46].

Las clasificaciones TNM y de la FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*), permiten clasificar a las pacientes con cáncer de vulva en base al tamaño de la lesión y la presencia o no de metástasis ganglionares o a distancia. En 2021, se publicó la última clasificación de la FIGO del cáncer de vulva, basada en el análisis de supervivencia de 12.063 pacientes con cáncer de vulva [100] (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de la FIGO 2021 para el carcinoma vulvar. Adaptada de Olawaiye AB et al. FIGO staging for carcinoma of the vulva: 2021 revision. Int J Gynaecol Obstet. 2021

Estadio	Descripción
I	Tumor limitado a la vulva IA Tamaño tumoral $\leq 2\text{cm}$ con invasión estromal $\leq 1\text{mm}$ ^a IB Tamaño tumoral $> 2\text{cm}$ con invasión estromal $> 1\text{mm}$ ^a
II	Tumor de cualquier tamaño con extensión al tercio inferior de la uretra, tercio inferior de la vagina o del ano y sin metástasis ganglionares
III	Tumor de cualquier tamaño, con diseminación a la parte superior de las estructuras perineales adyacentes o con cualquier número de ganglios linfáticos no fijos ni ulcerados IIIA Extensión a los dos tercios superiores de la uretra, o los dos tercios superiores de la vagina, o a la mucosa vesical, o la mucosa rectal, o con metástasis en los ganglios linfáticos regionales $\leq 5\text{ mm}$ IIIB Metástasis en ganglios linfáticos regionales (inguinales o femorales) $> 5\text{ mm}$ IIIC Metástasis en los ganglios linfáticos regionales (inguinales o femorales) con diseminación extracapsular
IV	Tumor de cualquier tamaño fijo al hueso o con metástasis linfáticas fijas o ulceradas o metástasis a distancia IVA Tumor fijado al hueso de la pelvis o con metástasis en ganglios linfáticos regionales (inguinales o femorales) fijos o ulcerados IVB Metástasis a distancia

^a La profundidad de la invasión se mide desde la membrana basal de la cresta papilar más profunda libre de tumor al punto de invasión más profundo.

Las principales características de esta nueva clasificación son:

- a) Recomienda describir la afectación ganglionar de forma análoga a la utilizada en el cáncer de cuello de útero, distinguiendo entre micrometástasis y macrometástasis (las células tumorales aisladas no contabilizan como metástasis ganglionares). Además del tamaño de la metástasis ganglionar, se contempla la presencia de invasión extracapsular.
- b) Incorpora el uso de técnicas de imagen para la estadificación, de forma similar a la clasificación del cáncer de cuello de útero.
- c) Es aplicable a todos los tipos morfológicos de cáncer de vulva, no solo el cáncer escamoso (excluyendo únicamente al melanoma vulvar).
- d) Recomienda documentar la asociación o no al VPH de la neoplasia, basada en el resultado del estudio inmunohistoquímico para p16 y/o de los test moleculares para VPH [100].

El tratamiento principal del carcinoma escamoso de la vulva es quirúrgico. Se recomienda la escisión completa de la lesión con márgenes libres (márgenes clínicos de 1 cm, aceptándose márgenes más estrechos en las áreas en las que el tumor es próximo a las estructuras de la línea media como clítoris, uretra, ano, con el objetivo de preservar su función). Es importante incluir las lesiones sugestivas de lesión preinvasiva dentro del área de resección (pudiendo realizarse una resección más superficial a este nivel). Si es necesario, se pueden emplear técnicas reconstructivas para facilitar el cierre primario de la herida. En caso de presentar márgenes quirúrgicos en contacto con la lesión, se recomienda realizar una ampliación de márgenes como tratamiento de elección (siendo la radioterapia la segunda opción de tratamiento) [46,47].

En las pacientes con tumores en estadio FIGO mayor a IA, se recomienda realizar una estadificación ganglionar inguinal [101]. Los tumores unifocales menores a 4 cm, sin ganglios sospechosos en el estudio de extensión, se pueden estadificar mediante la técnica

del ganglio centinela, que se deberá realizar de forma uni o bilateral según la distancia del borde medial del tumor a la línea media (mayor o menor de 1 cm). En caso de ganglio centinela positivo o imposibilidad de identificación del ganglio centinela, se debe realizar una linfadenectomía inguino-femoral homolateral. En el caso de tumores multifocales o mayores o iguales de 4 centímetros, se recomienda realizar una linfadenectomía inguino-femoral de los ganglios superficiales y profundos (unilateral si el margen medial dista más de 1 cm de la línea media o bilateral en caso contrario). Se puede valorar la realización de una linfadenectomía inguino-femoral contralateral en presencia de metástasis ganglionares ipsilaterales [46,47].

El tratamiento adyuvante con radioterapia está indicado en casos con presencia de márgenes quirúrgicos afectos e imposibilidad de ampliación quirúrgica de los mismos y se puede considerar cuando el margen quirúrgico se encuentra próximo al tumor, aunque no existe consenso sobre la distancia mínima al margen para su indicación. Otra indicación de la radioterapia adyuvante es en aquellas pacientes que presentan en la estadificación más de un ganglio inguino-femoral metastásico, en las que además de aconseja realizar radioterapia adyuvante sobre la ingle y valorar la posibilidad de añadir tratamiento quimioterápico sensibilizante [46,47].

Las pacientes con enfermedad avanzada no resecable se tratan con quimio-radioterapia, que en algunas ocasiones puede ser neoadyuvante y realizar posteriormente tratamiento quirúrgico con el objetivo de evitar una cirugía exenterativa de entrada [46,47].

La supervivencia a 5 años en las pacientes con cáncer de vulva es superior al 60-70% en estadios iniciales (I-II), pero disminuye ostensiblemente ante la presencia de enfermedad metastásica ganglionar (30-60%) o a distancia (<25%). Tanto en pacientes con enfermedad en estadio inicial como en aquellas con metástasis ganglionares, la mayoría de las recidivas son locales o ganglionares. La tasa de recurrencia local es del 24-36% en pacientes sin metástasis ganglionar y del 36-46% cuando existen metástasis ganglionares. La recidiva

ganglionar aislada ocurre en menos de un 3% de pacientes con ganglios negativos al diagnóstico y en un 8% de pacientes con ganglios positivos al diagnóstico [102,103]. Los principales factores pronósticos descritos en el carcinoma escamoso de la vulva son la presencia de metástasis ganglionares, el número y extensión de éstas, el estadio FIGO, la presencia de invasión linfovascular, el tamaño tumoral inicial y la edad de la paciente [102– 108].

Hipótesis

La incidencia de los carcinomas escamosos de pene y vulva muestra una marcada variabilidad geográfica, con una incidencia más alta en los países de renta baja y media, especialmente en el África subsahariana, el sur de Asia y Sudamérica, y una incidencia menor, aunque en aumento, en la mayoría de los países europeos y norteamericanos.

La epidemiología de estos carcinomas en las áreas de altos ingresos es relativamente bien conocida, pero la de aquellas zonas con mayor incidencia cuenta con muy pocos datos dado que la mayoría de los estudios publicados se basa en poblaciones europeas o norteamericanas.

En los países con menos recursos, la alta prevalencia de infección por VPH puede tener un impacto significativo en cuanto a la proporción de tumores asociados o independientes del virus. Así mismo, la alta prevalencia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en esas áreas geográficas podría tener también un alto impacto ya que esta infección multiplica el riesgo de infecciones persistentes por VPH y consecuentemente, conduce a un aumento de la incidencia de lesiones premalignas y carcinomas asociados al VPH.

La hipótesis principal de la presente tesis doctoral es que las notables diferencias epidemiológicas existentes en cuanto a la incidencia de cáncer de pene y vulva entre países de alta y baja renta estarían relacionadas con la diferente epidemiología de la infección VPH entre unas zonas geográficas y otras. Nuestra hipótesis es que en los países de renta alta la mayoría de los carcinomas de pene y de vulva se originaría a través de vías no relacionadas con el VPH mientras que, en los países de renta baja, y particularmente en el África Subsahariana, la mayoría de los tumores de ambas localizaciones debe tener relación con dicha infección. La confirmación de esta hipótesis podría tener un gran impacto para la prevención y el tratamiento de la enfermedad, puesto que implicaría que la vacuna para VPH podría prevenir un importante número de carcinomas de pene y vulva en estos países en los que las dos enfermedades son más frecuentes y en los que existe, así

mismo, mayor dificultad de acceso a recursos para diagnóstico precoz y tratamiento.

Para ello se presentan en esta tesis dos trabajos que comparan las características etiopatogénicas de estos tumores en Mozambique, un país sub-Sahariano del Sudeste de África con una alta prevalencia de VPH y VIH, con los de España, un país europeo con baja tasa de ambas infecciones. El primero de los trabajos estudia los carcinomas escamosos del pene y el segundo se centra en los carcinomas escamosos de la vulva.

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis doctoral es analizar las diferencias etiopatogénicas existentes entre los carcinomas de células escamosas del pene y de la vulva diagnosticados en Mozambique, un país africano con una alta prevalencia de VPH y de VIH, y las de los mismos tumores diagnosticados en España, un país europeo con baja prevalencia de ambas infecciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Analizar la contribución del VPH al desarrollo de los carcinomas de pene en Mozambique y España (estudio número 1).
2. Analizar las posibles diferencias entre Mozambique y España en cuanto a contribución de los diferentes genotipos de VPH, así como de infecciones por múltiples genotipos del virus, en el cáncer de pene (estudio número 1).
3. Estudiar las posibles diferencias demográficas entre los pacientes con tumores de pene de ambos países (estudio número 1).
4. Analizar la contribución del VPH al desarrollo de carcinomas de vulva en Mozambique y España (estudio número 2).
5. Analizar las posibles diferencias entre Mozambique y España en cuanto a contribución de los diferentes genotipos, así como de infecciones múltiples en cáncer de vulva (estudio número 2).
6. Estudiar las posibles diferencias demográficas entre los tumores de vulva de Mozambique y España (estudio número 2).
7. Estudiar la relación entre la positividad del ADN-VPH por PCR y la de la p16 por inmunohistoquímica (estudios números 1 y 2).
8. Analizar la contribución de las mutaciones de p53 en el desarrollo de los carcinomas de pene y vulva de ambos países (estudios números 1 y 2).
9. Determinar las consecuencias de las posibles diferencias epidemiológicas para los programas de prevención de cáncer de pene y vulva (estudios números 1 y 2).

Material, métodos y resultados

La presente tesis doctoral está conformada por dos estudios, que se detallan a continuación:

Artículo número 1

Autores: Manzotti C, Chulo L, López Del Campo R, Trias I, Del Pino M, Saúde O, Basílio I, Tchamo N, Lovane L, Lorenzoni C, Fernandes F, Saco A, Rodrigo-Calvo MT, Marimon L, Ismail MR, Carrilho C, Ribera-Cortada I, Ordi J, Rakislova N.

Título: Penile Squamous Cell Carcinomas in Sub-Saharan Africa and Europe: Differential Etiopathogenesis.

Revista: Cancers (Basel). 2022 Oct 27;14(21):5284. doi: 10.3390/cancers14215284. PMID: 36358704; PMCID: PMC9654935.

Factor de impacto: 5,200

Cuartil, área: Q2 Oncología

Artículo número 2

Autores: Rakislova N, Carreras-Dieguez N, Manzotti C, Saúde O, Del Pino M, Chulo L, Rangeiro R, Lovane L, Lorenzoni C, Fernandes F, Rodrigo-Calvo MT, Diaz-Mercedes S, Ribera-Cortada I, Sanfeliu E, Del Campo RL, Marimon L, Alós S, Vega N, Pérez FM, Trias I, Carrilho C, Ordi J.

Título: Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe.

Revista: Int J Cancer. 2023 Feb 1;152(3):496-503. doi: 10.1002/ijc.34314. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36214794.

Factor de impacto: 6,400

Cuartil, área: Q1 Oncología

La metodología y los resultados de los tres estudios se encuentran detalladamente descritas en las secciones correspondientes de cada trabajo, que se incluyen a continuación tal y como han sido publicados en la literatura científica.

Artículo número 1

Manzotti C, Chulo L, López Del Campo R, Trias I, Del Pino M, Saúde O, Basílio I, Tchamo N, Lovane L, Lorenzoni C, Fernandes F, Saco A, Rodrigo-Calvo MT, Marimon L, Ismail MR, Carrilho C, Ribera-Cortada I, Ordi J, Rakislova N. **Penile Squamous Cell Carcinomas in Sub-Saharan Africa and Europe: Differential Etiopathogenesis.** Cancers (Basel). 2022 Oct 27;14(21):5284.

RESUMEN

Los carcinomas escamosos de pene son clasificados por la OMS en dos categorías en función de su relación con el VPH: asociados al VPH e independientes del VPH. En este estudio comparamos una cohorte de carcinomas escamosos de pene de Mozambique, un país subsahariano del sudeste de África con una alta prevalencia de infección por VPH y VIH, y otra de España, un país del suroeste de Europa con baja prevalencia de infección por dichos virus, para estudiar la distribución de las categorías etiopatogénicas de estos tumores en ambos sitios. En el estudio se incluyó un total de 79 carcinomas escamosos de pene (28 de Mozambique y 51 de España). Todos los casos se sometieron a pruebas de PCR para detección y genotipado de VPH y estudio inmunohistoquímico para p16 y p53. Cualquier carcinoma escamoso de pene que mostrara sobreexpresión de p16 o ADN del VPH en el análisis por PCR se consideró como asociado al VPH.

En total, 40/79 (50,6 %) tumores fueron clasificados como asociados al VPH y 39 (49,4 %) se clasificaron como VPH independientes. Las neoplasias de los dos sitios mostraron marcadas diferencias entre sí: 25/28 (89,3 %) de los tumores procedentes de Mozambique y solo 15/51 (29,4 %) de los procedentes de España estaban asociados al VPH ($p < 0.001$). El VPH16 fue el genotipo de VPH más frecuente en ambos países, identificado en el 64,0 % (16/25) de los tumores asociados al VPH de Mozambique, y en el 60,0 % (9/15) de España ($p = 0.8$). Por término medio, los pacientes de Mozambique eran casi dos décadas menores que los de

España (edad media en años 50.9 ± 14.9 y 69.2 ± 13.3 , respectivamente [$p < 0.001$]).

En conclusión, en el presente estudio se observaron diferencias etiopatogénicas significativas entre los carcinomas escamosos de pene de Mozambique y los de España, con una prevalencia notablemente alta de tumores asociados al VPH en Mozambique y una prevalencia relativamente baja en España.

Estos datos pueden tener consecuencias importantes para la prevención primaria de los PSCC en todo el mundo, sugiriendo que la ampliación de los programas de vacunación contra el VPH a los hombres en los países de renta baja y media podría reducir una proporción significativa de los cánceres de pene en esta población, donde se presenta la mayor incidencia de estos tumores.

Article

Penile Squamous Cell Carcinomas in Sub-Saharan Africa and Europe: Differential Etiopathogenesis

Carolina Manzotti ^{1,2} , Laurina Chulo ³, Ricardo López del Campo ¹, Isabel Trias ¹, Marta del Pino ⁴ , Ofélia Saúde ³, Iracema Basílio ³, Nelson Tchamo ⁵, Lucilia Lovane ³ , Cesaltina Lorenzoni ^{3,6}, Fabiola Fernandes ^{3,6}, Adela Saco ¹, Maria Teresa Rodrigo-Calvo ¹, Lorena Marimon ^{1,2} , Mamudo R. Ismail ^{3,6} , Carla Carrilho ^{3,6} , Inmaculada Ribera-Cortada ¹, Jaume Ordi ^{1,2,*}  and Natalia Rakislova ^{1,2} 

- ¹ Department of Pathology, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
 - ² Barcelona Institute of Global Health (ISGlobal), University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
 - ³ Department of Pathology, Maputo Central Hospital, Maputo 1106, Mozambique
 - ⁴ Clinical Institute of Gynecology, Obstetrics, and Neonatology, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
 - ⁵ Department of Urology, Maputo Central Hospital, Maputo 1106, Mozambique
 - ⁶ Department of Pathology, Eduardo Mondlane University, Maputo 1106, Mozambique
- * Correspondence: jordi@clinic.cat

Simple Summary: We aimed to compare etiopathogenic features of 28 penile squamous cell carcinomas (PSCC) from Mozambique, an African country with a high prevalence of human papillomavirus (HPV) and HIV, with 51 PSCC from Spain, a European country with a low prevalence of HPV and HIV. All tumors underwent HPV testing and p16 and p53 immunohistochemistry. PSCC with either p16 overexpression and/or positivity for HPV were considered HPV-associated. The two sites showed striking etiopathogenic differences. Patients from Mozambique were significantly younger than those from Spain and showed mostly HPV-associated, p53-wild-type PSCC, contrary to older patients from Spain showing mostly HPV-independent, p53-altered tumors. These data may be valuable for primary prevention of PSCC worldwide.

Abstract: Penile squamous cell carcinomas (PSCC) are classified by the World Health Organization into two categories based on their relationship with the human papillomavirus (HPV): HPV-associated and HPV-independent. We compared a cohort of PSCC from Mozambique, a sub-Saharan country in southeast Africa with a high prevalence of HPV and HIV infection, and Spain, a country in southwestern Europe with a low prevalence of HPV and HIV, to study the distribution of the etiopathogenic categories of these tumors in both sites. A total of 79 PSCC were included in the study (28 from Mozambique and 51 from Spain). All cases underwent HPV-DNA polymerase chain reaction (PCR) testing, genotyping, and immunohistochemistry for p16 and p53. Any PSCC showing either p16 overexpression or HPV-DNA in PCR analysis was considered HPV-associated. Overall, 40/79 (50.6%) tumors were classified as HPV-associated and 39 (49.4%) as HPV-independent. The two sites showed marked differences: 25/28 (89.3%) tumors from Mozambique and only 15/51 (29.4%) from Spain were HPV-associated ($p < 0.001$). HPV16 was the most frequent HPV type identified in 64.0% (16/25) of the HPV-associated tumors from Mozambique, and 60.0% (9/15) from Spain ($p = 0.8$). On average, patients from Mozambique were almost two decades younger than those from Spain (mean age 50.9 ± 14.9 and 69.2 ± 13.3 , respectively [$p < 0.001$]). In conclusion, significant etiopathogenic differences between PSCC in Mozambique and Spain were observed, with a remarkably high prevalence of HPV-associated tumors in Mozambique and a relatively low prevalence in Spain. These data may have important consequences for primary prevention of PSCC worldwide.

Keywords: penile cancer; Mozambique; Spain; HPV; p16; p53



Citation: Manzotti, C.; Chulo, L.; López del Campo, R.; Trias, I.; del Pino, M.; Saúde, O.; Basílio, I.; Tchamo, N.; Lovane, L.; Lorenzoni, C.; et al. Penile Squamous Cell Carcinomas in Sub-Saharan Africa and Europe: Differential Etiopathogenesis. *Cancers* **2022**, *14*, 5284. <https://doi.org/10.3390/cancers14215284>

Academic Editor: David Wong

Received: 21 September 2022

Accepted: 25 October 2022

Published: 27 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Penile cancer is an uncommon malignancy with an estimated age-standardized incidence worldwide of 0.80 per 100,000 person-year in 2018 [1] that typically affects men in their fifth to seventh decades of life. Over 95% of penile cancers are penile squamous cell carcinomas (PSCC) [2]. Several risk factors for PSCC have been identified, including sexual behavior, history of warts/condylomas/human papillomavirus (HPV) infection, lack of circumcision, phimosis, poor penile hygiene, smoking and chronic inflammatory conditions such as lichen sclerosus [3]. In its 2016 classification, the World Health Organization (WHO) recommended separating PSCC based on their HPV status into HPV-associated and HPV-independent tumors [4,5], with this categorization having been maintained in the recent WHO 2022 revision [6]. This WHO classification recognizes a clear association between histological types and their relationship with HPV, with several histological variants of PSCC that are typically HPV-associated and other histological variants known as HPV-independent [6].

HPV-associated PSCC frequently arise on an intraepithelial precursor named HPV-associated penile intraepithelial neoplasia (PeIN), a lesion with a basaloid, warty, or warty-basaloid morphology [7], also called high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) according to the consensus of the Lower Anogenital Squamous Terminology standardization project [8]. HPV-associated PeIN is characterized by immature basal-appearing cells involving the whole thickness of the epithelium. Both HPV-associated PSCC and PeIN show strong, block type staining for p16 immunohistochemistry (IHC) [7,9–11]. Contrarily, HPV-independent PSCC frequently arise on a precursor lesion named non-HPV-related PeIN or differentiated PeIN, a lesion characterized by atypical basal cells with normal maturation in the superficial layers that usually develops in a context of inflammatory conditions of the penis, such as lichen sclerosus [7,9,10]. Both HPV-independent PSCC and its precursor lesion show no overexpression of p16 and frequently display an abnormal pattern of p53 [7,9,10].

The incidence of PSCC has marked geographical variability, with the highest incidence centered in low- and middle-income countries (LMIC), especially in southern Africa, South Asia, and South America, and a significantly lower, albeit rising, incidence in most European countries [12]. Unfortunately, while the epidemiology of PSCC in high-income areas is relatively well known, data on PSCC in LMIC, particularly in sub-Saharan Africa, are very sparse. The largest published study encompassing 1010 PSCC, involved only 19 tumors (1.8%) from sub-Saharan African countries [13]. The high prevalence of HPV infection may have a significant impact in terms of the proportion of HPV-associated and HPV-independent tumors. In addition, the high prevalence of HIV in these areas [14] may have also a significant impact in the rates of HPV-associated and -independent PSCC, as this condition multiplies the risk of persistent HPV infection and, consequently, leads to increased incidence of HPV-associated premalignant lesions and carcinomas [15].

The aim of this study was to compare the differential etiopathogenic characteristics of PSCC in Mozambique, a sub-Saharan country in South-East Africa with high prevalence of HPV and HIV and Spain, a European country with low rates of HPV and HIV [16].

2. Methods

2.1. Case Selection

The computer records of the Department of Pathology of the Maputo Central Hospital (MCH) and the Hospital Clinic of Barcelona (HCB)-two tertiary referral health institutions in Mozambique and Spain, respectively, were revised looking for all the cases diagnosed with PSCC. The period revised in the MCH was from January 2018 to December 2020, being from January 2000 to December 2020 in the HCB.

All PSCC identified during these periods were retrieved, and the material available was histologically reviewed. The inclusion criteria for the study were: (1) the presence of invasive PSCC and (2) the material available for HPV detection by polymerase chain reaction (PCR), and p16 and p53 IHC.

The ethics committees of both the Faculty of Medicine of the Eduardo Mondlane University & MCH and HCB approved the study (refs. CIBS FM&HCM/071/2017 and HCB/2020/1207, respectively).

2.2. Histological Review

Sections of all the tumors stained with hematoxylin and eosin were reviewed by two pathologists (CM, NR) to confirm the presence of invasive carcinoma. Following the WHO criteria, several histological types were considered as probably related to HPV (basaloid, papillary–basaloid, warty, wart–basaloid, clear cell, and lymphoepithelioma-like) and other histological variants were considered as not related to HPV infection (usual type [keratinizing], verrucous [including cuniculatum], papillary and sarcomatoid) [4,6]. After revision, the most representative and well-preserved paraffin block, containing the most obvious pathological findings of each case, was selected for HPV detection and IHC staining.

2.3. Tissue Preparation, Nucleic-Acid Isolation and HPV-DNA Detection

DNA extraction was performed on 10 µm whole sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissue from surgical specimens or penile biopsies. The microtome blade was replaced between cases. No microdissection was performed but, in all cases, the tissue analyzed included the invasive tumor. The highest safety measures were carried out while sectioning and performing sample preparation to avoid cross-contamination. DNA was extracted after overnight incubation in 20 µL of proteinase K solution at 56 °C. Subsequently, the DNA was isolated using a commercial kit (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit; Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturing instructions. Samples were quantified using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to determine DNA concentrations for the genotyping test. Samples with less than 10 µL of isolated DNA were excluded from the study.

The SPF10 PCR and LiPA25 system were used for HPV-DNA detection and typing (version 1, Labo Biomedical Products, Rijswijk, The Netherlands). A volume of 10 µL of isolated DNA was PCR-amplified using the INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II kit (Fujirebio, Gent, Belgium). The same kit was used for HPV genotyping. This system allows the genotyping of HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 26, 53, 66, 70, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83 and 89. HPV DNA-positive samples not hybridizing with any of the 32 probes were classified as HPV type X (HPV X or undetermined type). Each run was performed with positive and negative controls to monitor the efficiency of DNA isolation, PCR amplification, hybridization, and genotyping procedures.

2.4. p16 IHC

All tumors were stained with a p16 monoclonal antibody using the CINtec Histology Kit (clone E6H4; Roche-mtm-Laboratories, Heidelberg, Germany). The tumors were considered as p16 positive if they showed strong and diffuse block-like staining, and were considered as negative when the staining was patchy or completely negative.

All IHC stains were conducted at the department of Pathology of the HCB, employing the BenchMark ULTRA platform (Roche-Ventana, Tucson, AZ, USA).

2.5. Criteria for Classifying a Tumor as HPV-Associated or HPV-Independent

In this study any PSCC showing either p16 IHC overexpression and/or HPV-DNA in the PCR analysis were considered as HPV-associated. All PSCC showing a negative result for the two techniques (p16 IHC and HPV-DNA PCR) were considered as HPV-independent.

As it has recently been proposed that a second biomarker, such as p16 or E6*I mRNA, should also be used to consider a tumor as etiologically associated with HPV [13], a second, more restrictive scenario was also calculated, including only tumors showing both HPV-DNA in the PCR analysis and p16 IHC overexpression as HPV-associated. In this restrictive

scenario, tumors showing a discrepant result (HPV-DNA negative and p16 positive or HPV-DNA positive and p16 negative) were considered as HPV-independent.

2.6. p53 IHC

A monoclonal antibody was used for p53 staining (clone DO-7, Dako, Carpinteria, CA, USA). The interpretation of staining was conducted in the invasive tumor following the pattern-based framework recently developed for vulvar carcinomas [17,18]. This framework includes two normal (wild-type) and four abnormal (suggestive of mutant protein) patterns. Normal patterns included (a) scattered basal nuclear positivity (b) staining in cells in the mid-epithelial layers, with absent basal staining. Abnormal p53 patterns comprised: (1) basal overexpression (strong and continuous staining of the basal cells), (2) diffuse overexpression (strong and continuous staining of the basal and suprabasal cells) (3) cytoplasmic staining (with or without nuclear positivity), and (4) null pattern (absence of staining in the tumoral cells with conserved staining in the normal skin, stromal or inflammatory cells).

2.7. Statistical Analysis

The SPSS 28.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA) was used to perform the data analyses. Categorical variables are shown as absolute numbers and percentages. And were analyzed with the chi-square or Fisher exact test. Quantitative variables are shown as mean $\pm$ standard deviation, and were compared with Student's t test or analysis of variance test.

3. Results

3.1. General Features

Overall, 79 tumors were included in the study, 28 from the MCH (Mozambique) and 51 from the HCB (Spain). The age, HIV status, histological variant, p16 IHC, HPV-DNA PCR, and p53 IHC results of the PSCC from Mozambique and Spain are shown in Tables 1 and 2, respectively.

Table 1. Age, HIV status, histological variant, Human Papillomavirus (HPV)-DNA result, p16 and p53 immunohistochemical features of the tumors from Mozambique.

Case	Age	HIV Status	Histological Variant	p16 IHC	HPV-DNA Detection and Type	p53 IHC
HPV-associated carcinomas						
M2	40	NA	Warty/basaloid	+	70	Normal
M3	40	+	Usual type	+	45, 51, 70	Normal
M5	98	NA	Warty/basaloid	+	16	Normal
M7	44	NA	Basaloid	+	16	Normal
M8	38	NA	Warty/basaloid	+	18, 39	Normal
M10	62	—	Warty	+	16	Normal
M11	38	NA	Warty/basaloid	+	16	Normal
M12	39	NA	Warty/basaloid	+	16	Normal
M14	51	NA	Warty	+	18, 31, 44, 6	Normal
M15	41	NA	Warty/basaloid	+	16	Normal
M16	34	NA	Warty/basaloid	+	16	Normal
M17	30	NA	Basaloid	+	16	Normal
M18	39	NA	Warty/basaloid	+	16	Normal

Table 1. Cont.

Case	Age	HIV Status	Histological Variant	p16 IHC	HPV-DNA Detection and Type	p53 IHC
M20	43	+	Basaloid	+	16	Abnormal
M22	66	NA	Basaloid	+	68	Normal
M23	45	+	Warty/basaloid	+	16, 68	Normal
M24	51	+	Basaloid	+	16	Normal
M25	43	+	Warty	+	16	Normal
M27	68	+	Basaloid	+	16, 52, 82, 11	Normal
M28	52	—	Basaloid	+	16	Normal
M6	56	NA	Warty	+	Negative	Normal
M26	59	NA	Basaloid	+	Negative	Normal
M1	68	NA	Warty/basaloid	—	16, 11	Abnormal
M9	51	NA	Usual type	—	X	Normal
M13	53	NA	Basaloid	—	18, 31, 52	Normal
HPV-independent carcinomas						
M4	65	NA	Warty	—	Negative	Abnormal
M19	74	NA	Warty	—	Negative	Abnormal
M21	38	NA	Usual type	—	Negative	Abnormal

NA: not available; + positive; — negative; X: undetermined HPV genotype.

Table 2. Age, HIV status, histological variant, Human Papillomavirus (HPV)-DNA result, p16 and p53 immunohistochemical features of the tumors from Spain.

Case	Age	HIV Status	Histological Variant	p16	HPV-DNA Detection and Type	p53
HPV-associated carcinomas						
S3	51	—	Basaloid	+	16	Abnormal
S9	61	—	Warty	+	16	Normal
S14	58	—	Basaloid	+	16	Normal
S21	52	—	Usual type	+	16, 18	Normal
S22	81	—	Lymphoepithelioma-like	+	16	Normal
S38	45	+	Warty-basaloid	+	16	Normal
S45	67	—	Warty	+	6	Normal
S46	87	—	Warty-basaloid	+	16	Normal
S51	59	—	Basaloid	+	16	Normal
S12	60	—	Warty	+	—	Abnormal
S29	94	—	Basaloid	+	—	Normal
S30	63	—	Basaloid	+	—	Normal
S31	64	—	Basaloid	+	—	Normal
S13	60	—	Usual type	—	16	Abnormal
S49	76	—	Basaloid	—	X	Normal
HPV-independent carcinomas						
S1	62	—	Verrucous	—	—	Normal
S2	65	—	Usual type	—	—	Normal
S4	59	—	Usual type	—	—	Abnormal
S5	53	—	Usual type	—	—	Abnormal
S6	53	—	Usual type	—	—	Abnormal
S7	78	—	Usual type	—	—	Abnormal
S8	54	—	Usual type	—	—	Abnormal
S10	81	—	Usual type	—	—	Abnormal

Table 2. Cont.

Case	Age	HIV Status	Histological Variant	p16	HPV-DNA Detection and Type	p53
S11	83	—	Usual type	—	—	Normal
S15	74	—	Basaloid	—	—	Abnormal
S16	70	—	Usual type	—	—	Abnormal
S17	81	—	Usual type	—	—	Abnormal
S18	85	—	Warty-basaloid	—	—	Normal
S19	63	—	Usual type	—	—	Normal
S20	59	—	Usual type	—	—	Abnormal
S23	80	—	Usual type	—	—	Normal
S24	72	—	Basaloid	—	—	Abnormal
S25	74	—	Usual type	—	—	Normal
S26	73	—	Usual type	—	—	Normal
S27	77	—	Usual type	—	—	Abnormal
S28	65	—	Usual type	—	—	Abnormal
S32	85	—	Verrucous	—	—	Normal
S33	79	—	Usual type	—	—	Abnormal
S34	75	—	Usual type	—	—	Normal
S35	86	—	Usual type	—	—	Abnormal
S36	70	—	Verrucous (cuniculatum)	—	—	Normal
S37	56	—	Usual type	—	—	Abnormal
S39	59	—	Usual type	—	—	Abnormal
S40	40	—	Usual type	—	—	Abnormal
S41	83	—	Verrucous	—	—	Normal
S42	75	—	Usual type	—	—	Abnormal
S43	44	—	Usual type	—	—	Abnormal
S44	67	—	Warty-basaloid	—	—	Abnormal
S47	96	—	Usual type	—	—	Normal
S48	85	—	Usual type	—	—	Normal
S50	89	—	Usual type	—	—	Normal

NA: not available; + positive; — negative; X: undetermined HPV genotype.

The clinical presentation of PSCC was markedly different in the two sites, with the patients from Mozambique being on average almost two decades younger than patients from Spain (mean age of the patients from Mozambique 50.9 ± 14.9 years and mean age in Spain 69.2 ± 13.3 years [$p < 0.001$]). HIV status was available in 8 cases from Mozambique and in all cases from Spain. Six out of 8 (75.0%) of the Mozambican patients were HIV positive in contrast with 1/51 (1.9%) of the Spanish patients.

3.2. Association with HPV

Overall 40/79 (50.6%) tumors were classified as HPV-associated and 39 (49.4%) as HPV-independent. However, marked differences were observed between the two sites: 25/28 (89.3%) tumors from Mozambique vs. only 15/51 (29.4%) from Spain were HPV-associated. Using stricter criteria (restrictive scenario, i.e., HPV-DNA identified by PCR and p16 IHC overexpression) 20/28 PSCC (71.4%) from Mozambique and 9/51 (17.6%) from Spain were considered as HPV-associated. In both scenarios the differences were statistically significant ($p < 0.001$).

HPV16 was the most frequent HPV type identified in 64.0% (16/25) of the HPV-associated tumors from Mozambique and in 60.0% (9/15) of the tumors from Spain ($p = 0.8$). No differences in the distribution of HPV type were identified between the two sites in any of the scenarios ($p = 1$). The prevalence of infection by multiple HPV types was slightly higher in Mozambique than in Spain, although the differences did not reach statistical significance (28.0% [7/25] vs. 6.7% [1/15], respectively; $p = 0.219$).

3.3. Histological Subtypes

Of the 40 tumors associated with infection by HPV, 36 (90.0%) were of the histological variants defined as related to HPV according to the WHO (16 [40.0%] basaloid, 7 [17.5%] warty, 12 [30.0%] mixed basaloid/warty, and 1 [2.5%] lymphoepithelioma-like), but four (10.0%) were of the usual type, one of the variants considered as not related to HPV by the WHO. Contrarily, 33/39 (84.6%) of the HPV-independent PSCC were of the histological variants defined as not related to HPV according to the WHO (29 [74.4%] usual type, 3 [7.6%] verrucous, 1 [2.4%] cuniculatum), but 6 (15.4%) were variants classified as HPV-related by the WHO (2 [5.1%] basaloid, 2 [5.1%] warty, and 2 [5.1%] mixed warty/basaloid).

3.4. p53 IHC Results

p53 IHC showed a normal staining pattern suggestive of wild-type protein in 35/40 (87.5%) of the HPV-associated tumors, and only 5/40 (12.5%) showed an abnormal pattern suggestive of a mutated p53. No differences were observed between Mozambique and Spain ($p = 0.38$). Contrarily, the HPV-independent PSCC showed an abnormal pattern of p53 IHC staining in 24/39 (61.5%) and a normal pattern in 15/39 (38.5%) ($p < 0.0001$).

Figure 1 shows an example of the histological and IHC features of the HPV-associated and HPV-independent types of PSCC.

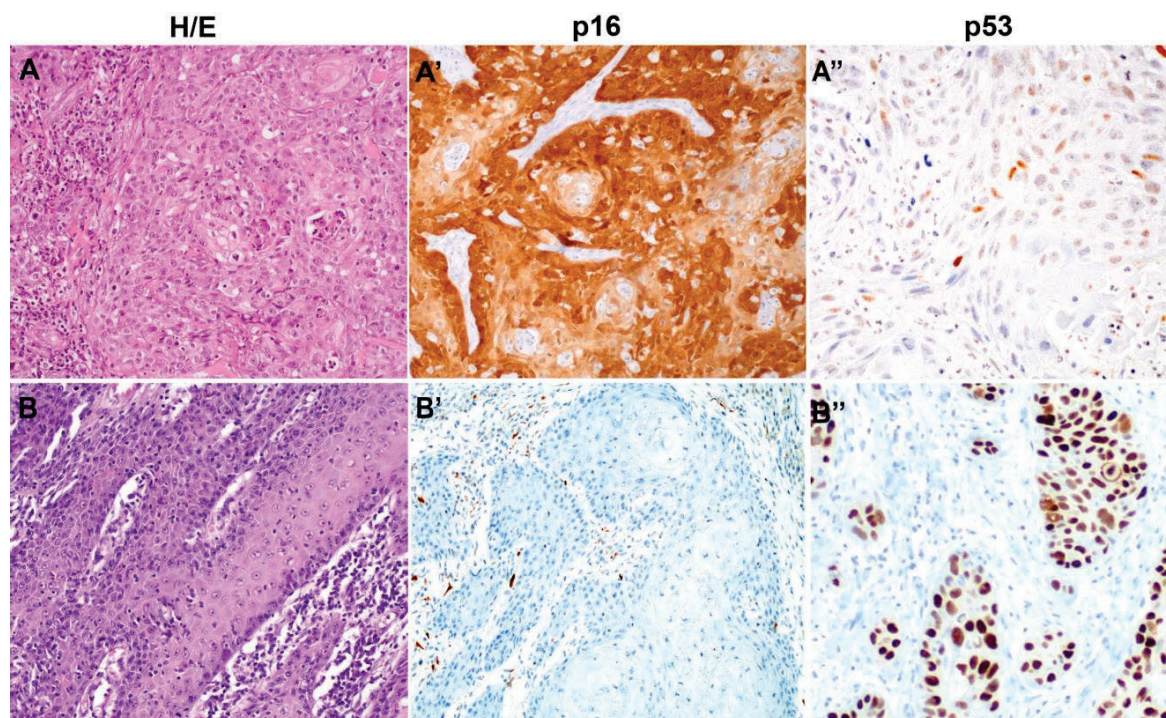


Figure 1. Histological and immunohistochemical features of a representative example of Human Papillomavirus (HPV)-associated (A,A',A'') and HPV-independent (B,B',B'') penile squamous cell carcinoma (PSCC). (A,B, hematoxylin and eosin, 200×), p16 (A',B') and p53 (A'',B''), HPV-associated PSCC, the most frequent type in Mozambique, is characterized by diffuse positive p16 staining and scattered irregular nuclear positivity for p53. HPV-independent PSCC, the most frequent type in Spain, is characterized by keratinizing histology, negative p16 staining and marked overexpression of p53.

4. Discussion

In this study we provide relevant information in relation to the epidemiology of PSCC in sub-Saharan Africa, a geographical area in which these data are particularly scant. Our series of PSCC from sub-Saharan Africa and Europe shows relevant etiopathogenic differences between the two sites and highlights the extremely high prevalence of HPV-

associated PSCC in Mozambique compared with the low prevalence in Spain. Over 89% of the PSCC in Mozambique but only 29% of the PSCC from Spain were HPV-associated ($p < 0.001$). Using the restrictive scenario (i.e., p16 IHC overexpression and HPV-DNA identified by PCR), the proportion of HPV-associated tumors from Mozambique was still extremely high (71.4%), whereas the percentage of HPV-associated tumors in Spain dropped to 17.6% ($p < 0.001$). HPV16 was the most frequent HPV type identified in both sites (64.0% and 60.0% HPV-associated tumors from Mozambique and Spain, respectively), similar to what has been reported in other studies [13,19].

The results of our Spanish cohort are in keeping with most studies from high-income countries. In these sites, PSCC is typically a disease of old men, and a significant proportion arise independently from HPV, frequently within the background of inflammatory conditions of the penile skin, such as lichen sclerosus and lichen simplex chronicus [13,14,20]. Contrarily, information from LMIC sites is very scant [21], but existing data suggest that PSCC may have a distinctive epidemiological background, with most tumors arising via an HPV-associated pathway [22]. A high prevalence of HPV infections has been reported in many LMIC, with Mozambique showing an incidence as high as 63% [23]. As HPV-associated tumors tend to affect younger individuals, patients from Spain were almost two decades older in average than patients from Mozambique, a pattern also observed in vulvar squamous cell carcinomas [24].

Although the high prevalence of HPV infection should be considered the main factor the high prevalence of HPV-associated PSCC in the Mozambican cohort, the high prevalence of HIV in Mozambique [25] has been suggested as a relevant contributor to the rise in HPV-associated carcinomas in Mozambique and also in other sub-Saharan countries [26]. A community-based study in a rural district of Maputo Province (Mozambique) showed a 37% prevalence of HIV in men 28–47 years old [25]. A high risk of developing HPV-related cancers [27] has been observed in people living with HIV, and the two viruses (HPV and HIV type 1) have been categorized as carcinogens by the International Agency for Research on Cancer [28]. Nevertheless, whereas the association between HIV and cervical cancer has been well established [29], the link between HPV-associated PSCC and HIV has not been evaluated. Interestingly, 75% of the Mozambican patients for whom clinical data were available were HIV positive. In contrast, the prevalence of HIV-positive patients in the Spanish series was 1.9%. Finally, the limited access to the health system might also contribute to this high incidence, as a large part of population in Mozambique lives in rural areas where access to health care is poor.

Interestingly, although 90% of the HPV-associated tumors were basaloid, warty, mixed basaloid/warty, or lymphoepithelioma-like, the types of PSCC considered, following the WHO classification, as tumors related to HPV [4,6], 10% of the HPV-associated PSCC in our series were of the usual type. Similarly, whereas 85% of the HPV-independent tumors were of the usual type or verrucous, 15% were basaloid, warty, or mixed warty/basaloid, in other words, the histological types considered in this classification as related to HPV. Similar results have been reported in the largest study on penile tumors [13]. These findings suggest that diagnosis based on pure morphological criteria may be misleading in a small but significant proportion of tumors and indicate that p16 IHC and/or HPV-DNA testing should be required to properly classify PSCC as HPV-associated or HPV-independent. In this regard, we recently reported that a small proportion of HPV-independent intraepithelial precursors of penile cancer may be indistinguishable from the HPV-associated precursors [30]. This overlap between HPV-associated and -independent tumors is a well-known phenomenon in vulvar tumors [31] and head and neck tumors, and the WHO classification of both types of neoplasms stresses the need for p16 IHC and/or HPV-DNA testing to adequately classify these tumors because of the better prognosis of HPV-associated compared with HPV-independent tumors in all these sites [32,33]. Growing evidence suggesting that this better behavior of HPV-associated tumors also applies to PSCC [34,35] stresses the need for these ancillary studies to properly classify PSCC. Nevertheless, ancillary studies to detect HPV in the tumor are probably not necessary in sub-Saharan countries, as most

PSCC are HPV-associated given that HPV-independent tumors are extremely infrequent and laboratory capacities are low [36].

Interestingly, abnormal p53 IHC-mutant patterns were identified in a high percentage of HPV-independent PSCC and in only a small percentage of HPV-associated tumors, a phenomenon already reported in studies based on IHC, in addition to studies analyzing TP53 mutations [37–39].

A subset of tumors showed discrepant p16 IHC and HPV-DNA results. It is difficult to draw conclusions on the significance of these findings and on whether these cases are or are not etiologically related to HPV with the data of the present study. It has recently been proposed that in addition to the identification of the DNA of the HPV, a second biomarker, such as p16 or E6 mRNA, should also be required to consider a tumor as etiologically associated with HPV [13]. On the other hand, studies conducted in vulvar squamous cell carcinoma suggest that p16 IHC is more reliable than HPV-DNA detection tests using formalin-fixed, paraffin-embedded material [31].

5. Conclusions

Most PSCC in Mozambique, a country in southeastern Africa, which probably reflects the epidemiological picture of many sub-Saharan African countries, are HPV-associated and arise in young men. In contrast, most PSCC diagnosed in Europe are HPV-independent and affect old men. These data suggest that extending HPV vaccination programs to males in LMIC could, in addition to the benefits of tackling the cervical cancer burden, reduce a significant proportion of penile cancer.

Author Contributions: Conceptualization, J.O., C.C., C.M., N.R. and M.d.P.; Methodology, L.C., C.M., A.S., I.T., L.M., R.L.d.C., N.T., O.S. and L.L.; Software, M.d.P. and C.M.; Validation, N.T., O.S., F.F., I.B., L.L., C.L., M.T.R.-C. and I.R.-C.; Formal Analysis, M.d.P., L.C., I.T., N.T., O.S. and M.R.I.; Investigation, C.C., F.F., L.C., L.L., I.T., I.R.-C., I.B., O.S., C.L., M.T.R.-C., M.R.I., N.T., L.M. and A.S.; J.O. and C.M. Resources, J.O. and C.C.; Data Curation, L.C., I.B., O.S. and C.C.; Writing—Original Draft Preparation, C.M., C.C., L.C., A.S., J.O., N.R., R.L.d.C., F.F. and M.R.I.; Writing—Review & Editing, A.S., C.C., C.M., F.F., L.L., I.T., I.R.-C., I.B., O.S., C.L., M.T.R.-C., M.R.I., M.d.P., N.T. and L.M.; L.C., I.R.-C., N.R. and J.O. Visualization, C.M. and J.O.; Supervision, I.R.-C., A.S., R.L.d.C. and L.M.; Project Administration, I.R.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: No official funding was received to carry out this work.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of the Eduardo Mondlane University/Maputo Central Hospital and Hospital Clínic of Barcelona (Protocol codes FM&HCM/071/2017 and HCB/2020/1207, respectively).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from the individuals involved in the study.

Data Availability Statement: All the data is shown in the manuscript.

Acknowledgments: The authors are thankful to the Pathology and MCH Cancer Registry databases for helping to obtain the data and the Calouste Gulbenkian Foundation, Portugal, and partners (Camões—Institute of Cooperation and Language, Portugal; Millennium BCP Foundation, Portugal; and Millennium BIM, Mozambique), which allowed the implementation of the MCH Cancer Registry under the project ‘Improving the diagnosis and treatment of oncological diseases in Mozambique’. ISGlobal receives support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through the “Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019–2023” Program (CEX2018-000806-S), and support from the Generalitat de Catalunya through the CERCA Program.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Barnholtz-Sloan, J.S.; Maldonado, J.L.; Pow-sang, J.; Guiliano, A.R. Incidence trends in primary malignant penile cancer. *Urol. Oncol.* **2007**, *25*, 361–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Daling, J.R.; Madeleine, M.M.; Johnson, L.G.; Schwartz, S.M.; Shera, K.A.; Wurscher, M.A.; Carter, J.J.; Porter, P.L.; Galloway, D.A.; McDougall, J.K.; et al. Penile cancer: Importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int. J. Cancer* **2005**, *116*, 606–616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Moch, H.; Cubilla, A.L.; Humphrey, P.A.; Reuter, V.E.; Ulbright, T.M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* **2016**, *70*, 93–105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Cubilla, A.L.; Velazquez, E.F.; Amin, M.B.; Epstein, J.; Berney, D.M.; Corbishley, C.M. Members of the ISUP Penile Tumor Panel The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: A review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. *Histopathology* **2018**, *72*, 893–904. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Moch, H.; Amin, M.B.; Berney, D.M.; Comp rat, E.M.; Gill, A.J.; Hartmann, A.; Menon, S.; Raspollini, M.R.; Rubin, M.A.; Srigley, J.R.; et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* **2022**, *82*, 458–468. [\[CrossRef\]](#)
7. Chaux, A.; Pfannl, R.; Lloveras, B.; Alejo, M.; Clavero, O.; Lezcano, C.; Muñoz, N.; de Sanjosé, S.; Bosch, X.; Hernández-Pérez, M.; et al. Distinctive association of p16INK4a overexpression with penile intraepithelial neoplasia depicting warty and/or basaloid features: A study of 141 cases evaluating a new nomenclature. *Am. J. Surg. Pathol.* **2010**, *34*, 385–392. [\[CrossRef\]](#)
8. Darragh, T.M.; Colgan, T.J.; Thomas Cox, J.; Heller, D.S.; Henry, M.R.; Luff, R.D.; McCalmont, T.; Nayar, R.; Palefsky, J.M.; Stoler, M.H.; et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: Background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2013**, *32*, 76–115. [\[CrossRef\]](#)
9. Chaux, A.; Velazquez, E.F.; Amin, A.; Soskin, A.; Pfannl, R.; Rodríguez, I.M.; Barreto, J.E.; Lezcano, C.; Ayala, G.; Netto, G.J.; et al. Distribution and characterization of subtypes of penile intraepithelial neoplasia and their association with invasive carcinomas: A pathological study of 139 lesions in 121 patients. *Hum. Pathol.* **2012**, *43*, 1020–1027. [\[CrossRef\]](#)
10. Chaux, A.; Pfannl, R.; Rodríguez, I.M.; Barreto, J.E.; Velazquez, E.F.; Lezcano, C.; Piris, A.; Netto, G.J.; Cubilla, A.L. Distinctive immunohistochemical profile of penile intraepithelial lesions: A study of 74 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **2011**, *35*, 553–562. [\[CrossRef\]](#)
11. Canete-Portillo, S.; Velazquez, E.F.; Kristiansen, G.; Egevad, L.; Grignon, D.; Chaux, A.; Cubilla, A.L. Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers V: Recommendations on the Use of Immunohistochemical and Molecular Biomarkers in Penile Cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **2020**, *44*, E80–E86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Fu, L.; Tian, T.; Yao, K.; Chen, X.-F.; Luo, G.; Gao, Y.; Lin, Y.-F.; Wang, B.; Sun, Y.; Zheng, W.; et al. Global Pattern and Trends in Penile Cancer Incidence: Population-Based Study. *JMIR Public Health Surveill.* **2022**, *8*, e34874. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Alemany, L.; Cubilla, A.; Halc, G.; Kasamatsu, E.; Quirós, B.; Masferrer, E.; Tous, S.; Lloveras, B.; Hernández-Suarez, G.; Lonsdale, R.; et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur. Urol.* **2016**, *69*, 953–961. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Dwyer-Lindgren, L.; Cork, M.A.; Sligar, A.; Steuben, K.M.; Wilson, K.F.; Provost, N.R.; Mayala, B.K.; VanderHeide, J.D.; Collison, M.L.; Hall, J.B.; et al. Mapping HIV prevalence in sub-Saharan Africa between 2000 and 2017. *Nature* **2019**, *570*, 189–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Looker, K.J.; R nn, M.M.; Brock, P.M.; Brisson, M.; Drolet, M.; Mayaud, P.; Boily, M.C. Evidence of synergistic relationships between HIV and Human Papillomavirus (HPV): Systematic reviews and meta-analyses of longitudinal studies of HPV acquisition and clearance by HIV status, and of HIV acquisition by HPV status. *J. Int. AIDS Soc.* **2018**, *21*, e25110. [\[CrossRef\]](#)
16. Nakagawa, F.; Phillips, A.N.; Lundgren, J.D. Update on HIV in Western Europe. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **2014**, *11*, 177–185. [\[CrossRef\]](#)
17. Rakislova, N.; Alemany, L.; Clavero, O.; Saco, A.; Torné, A.; Del Pino, M.; Munmany, M.; Rodrigo-calvo, M.T.; Guerrero, J.; Marimon, L.; et al. P53 immunohistochemical patterns in HPV-independent squamous cell carcinomas of the vulva and the associated skin lesions: A study of 779 cases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8091. [\[CrossRef\]](#)
18. Tessier-Cloutier, B.; Kortekaas, K.E.; Thompson, E.; Pors, J.; Chen, J.; Ho, J.; Prentice, L.M.; McConechy, M.K.; Chow, C.; Proctor, L.; et al. Major p53 immunohistochemical patterns in in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 1595–1605. [\[CrossRef\]](#)
19. Ferrándiz-Pulido, C.; Masferrer, E.; De Torres, I.; Lloveras, B.; Hernandez-Losa, J.; Mojal, S.; Salvador, C.; Morote, J.; Ramon, Y.; Cajal, S.; et al. Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell carcinomas: Correlation with pathologic subtypes, p16(INK4a) expression, and prognosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2013**, *68*, 73–82. [\[CrossRef\]](#)
20. Kirrander, P.; Sherif, A.; Friedrich, B.; Lambe, M.; Hakansson, U. Swedish National Penile Cancer Register: Incidence, tumour characteristics, management and survival. *BJU Int.* **2016**, *117*, 287–292. [\[CrossRef\]](#)

21. Bandini, M.; Ahmed, M.; Basile, G.; Watkin, N.; Master, V.; Zhu, Y.; Prakash, G.; Rodriguez, A.; Ssebakumba, M.K.; Leni, R.; et al. A global approach to improving penile cancer care. *Nat. Rev. Urol.* **2022**, *19*, 231–239. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Buonaguro, F.M.; Tornesello, M.L.; Salatiello, I.; Okong, P.; Buonaguro, L.; Beth-Giraldo, E.; Biryahwaho, B.; Sempala, S.D.K.; Giraldo, G. The uganda study on HPV variants and genital cancers. *J. Clin. Virol.* **2000**, *19*, 31–41. [\[CrossRef\]](#)
23. Maueia, C.; Murahwa, A.; Manjate, A.; Andersson, S.; Sacarlal, J.; Kenga, D.; Mussá, T.; Williamson, A.L. Identification of the Human Papillomavirus Genotypes, According to the Human Immunodeficiency Virus Status in a Cohort of Women from Maputo, Mozambique. *Viruses* **2021**, *14*, 24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Rakislova, N.; Manzotti, C.; Saude, O. Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe. *Int. J. Cancer* **2022**. *online ahead of print.* [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. González, R.; Mungambe, K.; Aponte, J.J.; Bavo, C.; Nhalungo, D.; Macete, E.; Alonso, P.L.; Menéndez, C.; Naniche, D. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: A community-based survey. *HIV Med.* **2012**, *13*, 581–588. [\[CrossRef\]](#)
26. Lorenzoni, C.; Vilajeliu, A.; Carrilho, C.; Ismail, M.R.; Castillo, P.; Augusto, O.; García-Basteiro, A.L.; Sidat, M.; de Sanjosé, S.; Menéndez, C.; et al. Trends in cancer incidence in Maputo, Mozambique, 1991–2008. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130469. [\[CrossRef\]](#)
27. Frisch, M.; Biggar, R.J.; Goedert, J.J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1500–1510. [\[CrossRef\]](#)
28. Known and Probable Human Carcinogens. Available online: <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes/general-info/known-and-probable-human-carcinogens.html> (accessed on 20 July 2022).
29. Stelzle, D.; Tanaka, L.F.; Lee, K.K.; Ibrahim Khalil, A.; Baussano, I.; Shah, A.S.V.; McAllister, D.A.; Gottlieb, S.L.; Klug, S.J.; Winkler, A.S.; et al. Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob. Health* **2021**, *9*, e161–e169. [\[CrossRef\]](#)
30. Ordi, J.; Alejo, M.; Fusté, V.; Lloveras, B.; Del Pino, M.; Alonso, I.; Torné, A. HPV-negative vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) with basaloid histologic pattern: An unrecognized variant of simplex (differentiated) VIN. *Am. J. Surg. Pathol.* **2009**, *33*, 1659–1665. [\[CrossRef\]](#)
31. Rakislova, N.; Clavero, O.; Alemany, L.; Saco, A.; Quirós, B.; Lloveras, B.; Alejo, M.; Pawlita, M.; Quint, W.; del Pino, M.; et al. Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: A study of 1594 cases. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 2517–2527. [\[CrossRef\]](#)
32. WHO. Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth Edition—WHO—OMS. Available online: <https://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4006> (accessed on 29 December 2019).
33. El-Naggar, A.K.; Chan, J.K.C.; Grandis, J.R.; Takata, T.S.P. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*; WHO: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 978-92-832-2438-9.
34. Wang, B.; Gu, W.; Wan, F.; Wei, Y.; Xiao, W.; Lu, X.; Zhang, G.; Zhou, J.; Wang, Q.; Ding, X.; et al. Prognosis of the 8th TNM Staging System for Penile Cancer and Refinement of Prognostication by Incorporating High Risk Human Papillomavirus Status. *J. Urol.* **2020**, *203*, 562–569. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Sand, F.L.; Rasmussen, C.L.; Frederiksen, M.H.; Andersen, K.K.; Kjaer, S.K. Prognostic Significance of HPV and p16 Status in Men Diagnosed with Penile Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2018**, *27*, 1123–1132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Wilson, M.L.; Fleming, K.A.; Kuti, M.A.; Looi, L.M.; Lago, N.; Ru, K. Access to pathology and laboratory medicine services: A crucial gap. *Lancet* **2018**, *391*, 1927–1938. [\[CrossRef\]](#)
37. McDaniel, A.S.; Hovelson, D.H.; Cani, A.K.; Liu, C.-J.; Zhai, Y.; Zhang, Y.; Weizer, A.Z.; Mehra, R.; Feng, F.Y.; Alva, A.S.; et al. Genomic Profiling of Penile Squamous Cell Carcinoma Reveals New Opportunities for Targeted Therapy. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 5219–5227. [\[CrossRef\]](#)
38. Feber, A.; Worth, D.C.; Chakravarthy, A.; de Winter, P.; Shah, K.; Arya, M.; Saqib, M.; Nigam, R.; Malone, P.R.; Tan, W.S.; et al. CSN1 Somatic Mutations in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 4720–4727. [\[CrossRef\]](#)
39. Wang, Y.; Wang, K.; Chen, Y.; Zhou, J.; Liang, Y.; Yang, X.; Li, X.; Cao, Y.; Wang, D.; Luo, L.; et al. Mutational landscape of penile squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1280–1289. [\[CrossRef\]](#)

Artículo número 2

Rakislova N, Carreras-Dieguez N, Manzotti C, Saúde O, Del Pino M, Chulo L, Rangeiro R, Lovane L, Lorenzoni C, Fernandes F, Rodrigo-Calvo MT, Diaz-Mercedes S, Ribera-Cortada I, Sanfeliu E, Del Campo RL, Marimon L, Alós S, Vega N, Pérez FM, Trias I, Carrilho C, Ordi J.

Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe. Int J Cancer. 2023 Feb 1;152(3):496-503

RESUMEN

Se han descrito dos vías patogénicas para los carcinomas de células escamosas vulvares, una asociada al virus del papiloma humano y otra independiente del virus. Comparamos las características etiopatogénicas de una serie de carcinomas de células escamosas vulvares de Mozambique, un país subsahariano con alta prevalencia de VPH y VIH, con las de España, un país europeo con baja prevalencia de estos virus. Se incluyeron todos los carcinomas de células escamosas vulvares diagnosticados en las dos instituciones entre enero de 2018 y diciembre de 2020 (n = 35 y n = 41, respectivamente). En todos los casos se realizó detección y genotipado del ADN del VPH y estudio inmunohistoquímico para p16 y p53. Los tumores que presentaban tinción inmunohistoquímica positiva para p16 o positividad de ADN del VPH en el estudio por PCR se consideraron asociados al VPH.

34/35 tumores (97 %) procedentes de Mozambique y 8/41 (19 %) de España estaban asociados al VPH (p < 0.001). La edad media de los pacientes de Mozambique y España fue de 45 ± 12 años y de 72 ± 14, respectivamente (p < 0.001). No se encontraron diferencias en términos de genotipos del VPH ni de tasas de infección por múltiples genotipos de VPH. 1/35 tumores (3 %) procedentes de Mozambique y 29/41 (70 %) de España presentaban inmunotinción para p53 con un patrón anormal (p < 0.001).

A diferencia del predominio de carcinomas de células escamosas vulvares VPH-independiente que afecta a mujeres de edad avanzada en Europa, la mayor parte de los carcinomas de células

escamosas vulvares en el África subsahariana está asociada al VPH y se produce en mujeres jóvenes.

Estos datos pueden tener consecuencias importantes para la prevención primaria del carcinoma escamoso vulvar en todo el mundo, sugiriendo que la aplicación de programas de vacunación contra el VPH podría proteger a la mayoría de las mujeres del África sub-Sahariana de la mayoría de los cánceres de vulva.

Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe

Natalia Rakislova^{1,2,3}  | Nuria Carreras-Diequez⁴ | Carolina Manzotti^{2,3}  |
Ofelia Saúde⁵ | Marta del Pino^{4,6}  | Laurina Chulo⁵ | Ricardina Rangeiro⁷ |
Lucilia Lovane⁵ | Cesaltina Lorenzoni^{5,8} | Fabiola Fernandes^{5,8} |
Maria Teresa Rodrigo-Calvo² | Sherley Diaz-Mercedes² |
Inmaculada Ribera-Cortada² | Esther Sanfeliu² | Ricardo López del Campo² |
Lorena Marimon³ | Silvia Alós² | Naiara Vega² | Francisco M. Pérez² |
Isabel Trias² | Carla Carrilho^{5,8}  | Jaume Ordi^{2,3} 

¹Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, c. Casanova, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

²Department of Pathology, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Pathology, Barcelona Institute of Global Health (ISGlobal), Hospital Clínic—Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Clínic—Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Department of Pathology, Hospital Central de Maputo, Maputo, Mozambique

⁶Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Central de Maputo, Maputo, Mozambique

⁸Department of Pathology, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Mozambique

Correspondence

Jaume Ordi, Department of Pathology, ISGlobal-Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain.
Email: jordi@clinic.cat

Funding information

Instituto de Salud Carlos III and European Union, Grant/Award Number: PI17/00772;

Abstract

Two pathways have been described for vulvar squamous cell carcinomas (VSCC), one associated with human papillomavirus (HPV), and the other HPV-independent. We compared the etiopathogenic features of a series of VSCC from Mozambique, a sub-Saharan country with high prevalence of HPV and HIV, with those of Spain, a European country with low prevalence of HPV and HIV. All VSCC diagnosed at the two institutions from January 2018 to December 2020 were included ($n = 35$ and $n = 41$, respectively). HPV DNA detection and genotyping, and immunohistochemistry for p16 and p53 were performed. Tumors showing p16 positive staining and/or HPV DNA positivity were considered HPV-associated. 34/35 tumors (97%) from Mozambique and 8/41 (19%) from Spain were HPV-associated ($P < .001$). Mean age of the patients from Mozambique and Spain was 45 ± 12 and 72 ± 14 , respectively ($P < .001$). No differences were found in terms of HPV genotypes or multiple HPV infection rates. 1/35 tumors (3%) from Mozambique and 29/41 (70%) from Spain showed abnormal p53 immunostaining ($P < .001$). In contrast with the predominance of HPV-independent VSCC affecting old women in Europe, most VSCC in sub-Saharan Africa are HPV-associated and arise in young women. This data may have important consequences for primary prevention of VSCC worldwide.

KEYWORDS

HPV, Mozambique, p16, p53, Spain, vulvar cancer

Abbreviations: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; HPV, human papillomavirus; IHC, immunohistochemical; PCR, polymerase chain reaction; SCC, squamous cell carcinomas; VSCC, vulvar squamous cell carcinoma; WHO, World Health Organization.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *International Journal of Cancer* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of UICC.

Project PI20/00368; Caracterizaci3n gen3tica de los carcinomas de vulva independientes de virus del papiloma humano y de sus precursores", Grant/Award Number: PI20/00368

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) can arise from HPV or non-HPV causes, and that affects prognosis. Here, the authors compared VSCC samples from a population in Mozambique, where HPV prevalence is high, with those from Spain, where it is low. In Mozambique, 97% of VSCC were HPV-associated, based on p16 staining and HPV DNA positivity, compared with only 19% of VSCC in Spain. Mean age of patients in Mozambique was 45, vs 72 in Spain. Vaccination programs, the authors suggest, could therefore help prevent the majority of VSCC in sub-Saharan Africa.

1 | INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) is a well-established cause of a variety of human cancers, which include anogenital neoplasms (cervix, anal canal, vulva, vagina and penis) as well as head and neck tumors.¹ In contrast with the uterine cervix, where HPV is etiologically involved in the vast majority of cancers,¹ in other anatomical sites, such as the head and neck, the penis or the vulva, a second, HPV-independent, etiopathogenic pathway is responsible of a significant proportion of tumors. In all these sites, both HPV-associated and HPV-independent tumors are squamous cell carcinomas (SCCs), and this histological type represents over 90% of the malignant neoplasms. In vulvar squamous cell carcinomas (VSCC), it is traditionally accepted that basaloid or warty subtypes are associated with HPV,² while keratinizing variants tend to arise independently of HPV infection.³ However, pure histological criteria have shown limitations in classifying a VSCC as HPV-associated or independent.⁴ Interestingly, a number of studies have consistently shown that, in practically all the anatomical sites, HPV-associated tumors have better prognosis than HPV-independent carcinomas.^{5,6} Due to this prognostic relevance and the consequences in terms of possible prevention related to HPV vaccination programs, the last revisions of the WHO classifications of cancers of the vulva,⁷ vagina,⁷ the penis,⁸ or the head and neck⁹ separate SCCs into two main categories, HPV-associated and HPV-independent. Due to the limitations of pure histological criteria and the assumed sensitivity and specificity of molecular techniques of HPV detection¹⁰ and p16 immunohistochemical (IHC) staining, a surrogate biomarker of HPV status,¹¹ HPV detection and/or p16 IHC are considered by the World Health Organization (WHO) as essential diagnostic criteria for VSCC.

The proportion of HPV-associated and -independent VSCC is variable depending on the geographic area.¹⁰ Several studies, mainly conducted in Europe and USA have shown that most vulvar tumors arise independently of HPV. These studies show percentages of HPV-associated VSCC that range from 15% to 20% in Europe to 40% to 50% in the USA.^{4,10} However, in contrast with the relatively well-known epidemiology of vulvar cancer in these high-income sites, there is very scant information on the etiopathogenic features of VSCC in many low-income areas and particularly, in sub-Saharan Africa. Indeed, the pivotal study published by de Sanjose et al comprising over 1700 carcinomas of the vulva included only a very minor subset of tumors from sub-Saharan Africa.¹⁰ Remarkably, these regions have marked differences in terms of HPV prevalence, which

may result in pronounced variations in the proportion of HPV-associated and -independent tumors. Moreover, some of these regions have a high proportion of people living with HIV frequently associated with severe acquired immunodeficiency syndrome (AIDS),¹² a condition that increases the risk of persistent HPV-infections and HPV-associated carcinomas.¹³

In this study, we compared the etiopathogenic features of a series of VSCC from Mozambique, a sub-Saharan country in South-East Africa with high prevalence of HPV and HIV/AIDS, with those of Spain, a country in South-Western Europe with relatively low prevalence of HPV and HIV.

2 | METHODS

2.1 | Case selection

The files of the departments of Pathology and the hospital-based cancer registry of the Maputo Central Hospital, a 1500-bed hospital that is the only quaternary care center in Mozambique and a national referral center in Maputo, Mozambique, and the Hospital Clinic of Barcelona, a 700-bed tertiary referral center in Barcelona, Spain, from January 2018 to December 2020 were reviewed. All cases diagnosed as VSCC during this period were retrieved, and the available material was reviewed. All cases fulfilling the following inclusion criteria were included in the study: (1) presence of invasive VSCC in the vulva and (2) available material for histological revision and HPV detection by polymerase chain reaction (PCR) and p16 IHC in the invasive tumor.

2.2 | Histological revision and review of the clinical charts

Hematoxylin and eosin sections of all tumors were reviewed. In the histological revision, the presence of invasive carcinoma was confirmed, the histological variant of the tumor was assessed (keratinizing, nonkeratinizing, basaloid, warty, verrucous, etc.) and the most representative and well-preserved paraffin-embedded block was selected for HPV detection and IHC staining.

All the histological slides were evaluated by two gynecological pathologists with expertise in vulvar pathology (NR, JO). The

observers were aware of the geographical origin of the cases but were blind to the HPV testing results.

The clinical charts from all patients were reviewed.

2.3 | Tissue preparation, nucleic-acid isolation and HPV-DNA detection

DNA extraction was performed on whole sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissue from surgical specimens or vulvar biopsies as previously described. In all cases, the analyzed tissue included the invasive tumor, but no microdissection was performed. Sectioning and sample preparation were carried out with the highest safety measures to avoid cross-contamination.

HPV DNA detection and typing were performed using SPF10 PCR and the LiPA25 system (version 1, Labo Biomedical Products, Rijswijk, The Netherlands). A volume of 10 µl of isolated DNA was used for PCR amplification through the SPF10-LiPA system (Fujirebio, Gent, Belgium). HPV genotyping was conducted using INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II kit (Fujirebio, Gent, Belgium). This system allows the amplification and genotyping of high-risk HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68; of the probable high-risk HPV 26, 53, 66, 70, 73 and 82; and of low-risk HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83 and 89. Quality in each run was confirmed with both positive and negative controls for DNA isolation, amplification, hybridization and genotyping.

2.4 | p16 and p53 IHC

All cases were stained with a p16 monoclonal antibody using the CINtec Histology Kit (clone E6H4; Roche-mtm-Laboratories, Heidelberg, Germany). Tumors showing strong and diffuse block-like staining were considered as positive (p16 upregulation), whereas patchy or completely negative p16 staining was considered as p16 negative.^{11,14}

All cases were stained for p53 with the monoclonal antibody (clone DO-7; Dako, Carpinteria, CA). The IHC staining was evaluated in the invasive tumor following the recent p53 pattern-based interpretation framework,^{15,16} which includes six major categories: two normal (wild-type) and four abnormal (mutant) patterns.

Normal patterns, suggestive of wild-type p53 protein included: (1) scattered (occasional positive nuclei in the basal and/or parabasal layer) and (2) mid-epithelial staining with basal sparing (moderate to strong nuclear p53 staining in the parabasal layers staining, with sparing of the basal cells).

Abnormal p53 staining patterns, suggestive of mutant protein included: (1) basal overexpression (continuous, strong staining of the nuclei in the basal layer), (2) diffuse (parabasal) overexpression (continuous, strong staining of the nuclei in the basal layer with suprabasal extension of the positive cells), (3) cytoplasmic (cytoplasmic staining with or without nuclear expression) and (4) null patterns (complete

absence of staining in the tumor, with evidence of intrinsic positive control in the adjacent skin, stromal or inflammatory cells).^{15,16}

All IHC stains were performed using the automated BenchMark ULTRA platform (Ventana, Tucson, AZ). All IHC and molecular analysis were performed at the pathology department of the Hospital Clinic in Barcelona.

2.5 | Criteria for classifying a tumor as HPV-associated or HPV-independent

All tumors showing positive p16 IHC staining, independently of the results of the HPV detection and typing, or positive result of the HPV detection, independently of the results of p16 IHC, were considered as HPV-associated, whereas cases negative for both techniques were considered as HPV-independent. Histological features and p53 IHC staining were not considered for classifying a tumor as HPV-associated or independent.

2.6 | Statistical analysis

Data analyses were performed with the SPSS 23.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL). Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages. The chi-square exact test was used to compare qualitative variables. Quantitative variables were expressed as mean ± SD, and the Student's *t* or analysis of variance tests were used for comparisons.

3 | RESULTS

3.1 | General features

From January 2018 to December 2020, 41 VSCC were diagnosed at the Maputo Central Hospital (Mozambique) and 41 at the Hospital Clínic of Barcelona (Spain). From the 41 cases initially diagnosed in Mozambique, four were excluded because of the absence of invasive carcinoma, and two because of the absence of sufficient material for further analysis. None of the cases from Spain were excluded. Thus, finally 35 patients from Mozambique and 41 from Spain fulfilled the inclusion criteria. Mean age of the patients from Mozambique and Spain was 45 ± 12 and 72 ± 14, respectively ($P < .001$). Tables 1 and 2 show the age and HIV status of the patients from Mozambique and Spain, respectively. The information of the HIV status was available in only nine out of the 35 patients from Mozambique, but seven of them (78%) were positive. All patients from Spain were HIV negative. Histologically, 12 tumors from Mozambique were basaloid, six were nonkeratinizing, four were warty and 13 keratinizing. In the Spanish series, seven were basaloid, one were nonkeratinizing, three were warty and 30 keratinizing (including a verrucous carcinoma). The distribution of histological variants was significantly different between the countries ($P = .008$).

TABLE 1 Age, histological variant, HPV-DNA result, p16 and p53 IHC of the tumors from Mozambique

Case	Age	HIV	Histological variant	p16	HPV-DNA	p53
M1	43	—	Keratinizing	+	Negative	Wild type
M2	28	NA	Basaloid	+	16	Wild type
M3	50	NA	Nonkeratinizing	+	X	Wild type
M4	43	NA	Nonkeratinizing	+	31-33-52-58-70	Wild type
M5	51	+	Basaloid	+	16	Wild type
M6	39	NA	Keratinizing	+	Negative	Wild type
M7	32	NA	Nonkeratinizing	+	Negative	Wild type
M8	38	NA	Warty	—	6	Wild type
M9	60	NA	Basaloid	+	16-58	Wild type
M10	58	—	Keratinizing	+	16	Wild type
M11	75	NA	Warty	+	18	Wild type
M12	40	NA	Basaloid	+	18-52-56-58-82	Wild type
M13	37	NA	Keratinizing	+	16	Wild type
M14	33	NA	Keratinizing	+	33	Wild type
M15	49	+	Keratinizing	+	16-51	Mutated
M16	66	NA	Keratinizing	+	18	Wild type
M17	44	+	Keratinizing	+	Negative	Wild type
M18	41	NA	Basaloid	+	Negative	Wild type
M19	26	NA	Keratinizing	+	16	Wild type
M20	39	+	Basaloid	+	Negative	Wild type
M21	33	NA	Keratinizing	+	16	Wild type
M22	45	NA	Warty	+	33-58-68-82	Wild type
M23	50	NA	Basaloid	+	33	Wild type
M24	45	NA	Nonkeratinizing	+	Negative	Wild type
M25	42	NA	Basaloid	+	33	Wild type
M26	32	NA	Nonkeratinizing	+	Negative	Wild type
M27	80	NA	Keratinizing	—	Negative	Wild type
M28	52	NA	Keratinizing	+	Negative	Wild type
M29	38	NA	Basaloid	+	Negative	Wild type
M30	54	NA	Basaloid	+	33	Wild type
M31	41	+	Keratinizing	+	X	Wild type
M32	28	NA	Basaloid	+	31-58	Wild type
M33	44	+	Warty	+	16-52	Wild type
M34	45	+	Nonkeratinizing	+	Negative	Wild type
M35	49	NA	Basaloid	+	Negative	Wild type

Abbreviation: NA, not available.

3.2 | Association with HPV-DNA and p16 IHC results

Thirty-four out of 35 tumors (97.1%) from Mozambique and 8/41 (19.5%) from Spain were HPV-associated ($P < .001$).

In the series from Mozambique HPV-DNA was positive in 22 (62.9%) of the tumors. p16 IHC was positive in 33/35 tumors (94.3%), 12 (36.4%) of whom had negative HPV-DNA. Only one tumor positive for HPV-DNA showed negative p16 IHC. In this tumor HPV6 was identified. HPV16 (43%), HPV33 (29%), HPV58 (24%) and HPV18 (14%) were the HPV types more frequently identified in

Mozambique. Seven tumors showed infection by multiple HPV types. Table 1 shows the histological variant, HPV-DNA result, as well as p16 and p53 IHC staining of the tumors from Mozambique.

In the series from Spain HPV-DNA was positive in 7 (17.1%) of the tumors. p16 IHC was positive in 8/41 tumors (19.5%), and only one of them (12.5%) had negative HPV-DNA. No tumors were negative for p16 and positive for HPV-DNA. HPV16 (50%), HPV33 (25%), HPV53 (7%) and HPV56 (7%) were the HPV types more frequently identified in Spain. Two tumors showed infection by multiple HPV types. Table 2 shows the histological variant, HPV-DNA result, p16 and p53 IHC of the tumors from Spain. Figure 1 illustrates histological

Case	Age	HIV	Histological variant	p16	HPV-DNA	p53
S1	69	—	Basaloid	+	Negative	Wild type
S2	83	—	Keratinizing	—	Negative	Wild type
S3	92	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S4	84	—	Keratinizing	—	Negative	Wild type
S5	47	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S6	86	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S7	86	—	Verrucous	—	Negative	Wild type
S8	58	—	Basaloid	+	33	Wild type
S9	61	—	Keratinizing	—	Negative	Wild type
S10	73	—	Keratinizing	+	56	Wild type
S11	53	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S12	77	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S13	50	—	Basaloid	+	16	Wild type
S14	58	—	Warty	+	16-53	Wild type
S15	81	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S16	61	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S17	78	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S18	82	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S19	82	—	Warty	—	Negative	Mutated
S20	69	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S21	82	—	Keratinizing	—	Negative	Wild type
S22	78	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S23	54	—	Basaloid	+	16	Wild type
S24	78	—	Warty	—	Negative	Mutated
S25	74	—	Basaloid	+	6, 16	Mutated
S26	87	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S27	90	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S28	62	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S29	85	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S30	90	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S31	58	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S32	64	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S33	70	—	Nonkeratinizing	—	Negative	Mutated
S34	90	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S35	67	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S36	82	—	Basaloid	—	Negative	Mutated
S37	90	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S38	46	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S39	50	—	Keratinizing	+	33	Wild type
S40	88	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated
S41	47	—	Keratinizing	—	Negative	Mutated

TABLE 2 Age, histological variant, HPV-DNA result, p16 and p53 IHC of the tumors from Spain

and IHC features of each of the two types of VSCC, HPV-associated and HPV-independent.

No significant differences were found in terms of percentage of HPV genotypes between the two countries.

3.3 | p53 IHC results

One out of 35 tumors (3%) from Mozambique and 29/41 (70%) from Spain showed abnormal pattern of p53 immunostaining ($P < .001$).

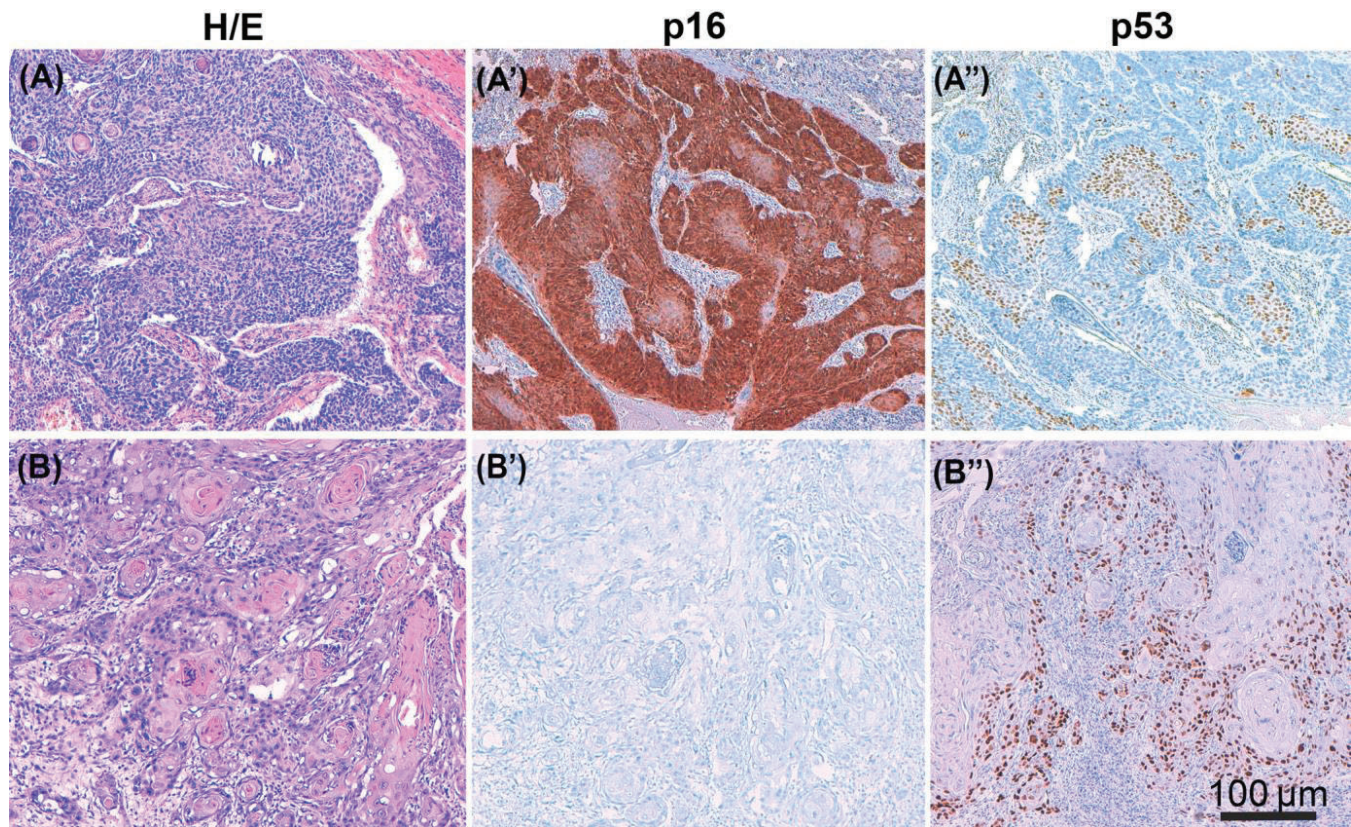


FIGURE 1 A characteristic example of each of the two types of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC), HPV-associated and HPV-independent. The former being predominant in sub-Saharan countries such as Mozambique and the latter in European countries such as Spain. (A) HPV-associated invasive VSCC (H&E $\times 200$) with basaloid histology, positive p16 staining (A') and wild-type p53 staining showing mid-epithelial pattern (A''). (B) HPV-independent invasive VSCC (H&E $\times 200$) with keratinizing histology, negative p16 staining (B') and abnormal p53 staining showing overexpression pattern (B'')

4 | DISCUSSION

Our study provides relevant data on the epidemiology of VSCC in sub-Saharan Africa, a geographical region where this information is almost nonexistent. Our series highlight the exceptionally high prevalence of HPV in VSCC in Mozambique and confirms that marked etiopathogenic differences exist between VSCC in sub-Saharan Africa and Europe. Thus, over 95% of the VSCC in Mozambique but only 19% of the VSCC from Spain were HPV-associated. In accordance with these etiopathogenic differences, the clinical presentation was also markedly different, with patients from Spain being almost three decades older in average than patients from Mozambique.

The findings observed in our series from Spain are in keeping with most series reported from high-income countries,^{6,10,14} where VSCC is typically a disease of older women, and arise independently from HPV, in association with inflammatory and reactive lesions of the vulvar skin, such as lichen sclerosus and lichen simplex chronicus.

Contrarily, the sub-Saharan African series showed a completely different epidemiological pattern, with almost all tumors arising via an HPV-associated pathway. A high prevalence of ano-genital HPV infections has been reported in sub-Saharan African women.^{17,18} Indeed,

cancer of the uterine cervix, the most frequent malignant tumor associated with HPV, is the most common cancer in women in sub-Saharan Africa, with the highest incidence in Eastern and Southern Africa¹⁹⁻²¹ and an extremely high prevalence has been reported by our group in Southern Mozambique.²² Our results show that, although the current WHO 2020 classification separates VSCC into HPV-associated and HPV-independent tumors and recommends the use of HPV testing and/or p16 IHC for the proper classification, this requirement should probably be considered unnecessary in many sub-Saharan countries, where the number of HPV-independent tumors is likely to be extremely low, and the resources and laboratory capacities are, in general, particularly limited.²³

In addition to the high prevalence of HPV infection, the high prevalence of HIV infection in Mozambique²⁴ has been proposed as the most likely explanation for the increase in the incidence in cancer of the uterine cervix observed in Mozambique and several sub-Saharan countries.²² According to the UNAIDS Global Report, the prevalence of HIV in Mozambique was as high as 45% in women aged 28 to 47 in a community-based study in a rural district of Maputo province,²⁵ with a high number of patients not receiving antiretroviral treatment and presenting with AIDS.²⁶ People living with HIV are at a high risk of developing HPV-related cancers,²⁷ and both HPV and HIV

type 1 are classified as carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC).²⁸ However, in contrast to the relatively well-known association between HIV and cervical cancer, studies assessing the risk of developing VSCC among people living with HIV are missing. Remarkably, 78% of the patients from Mozambique in whom the information was available were HIV positive, which was in contrast with the 0% of HIV-positive patients in the Spanish cohort.

The results of our study, showing a relatively high proportion of tumors strongly positive for p16 but negative for HPV-DNA, suggest that p16 IHC is more robust and reliable than HPV-DNA detection in formalin-fixed, paraffin-embedded material, which is the type of sample usually available for many solid tumors such as VSCC.⁴ The finding of wild-type p53 IHC staining, the usual pattern in HPV-associated VSCC,¹⁵ in all tumors from Mozambique contrasts with the high proportion of VSCC from Spain with an abnormal p53 IHC staining, the commonest IHC staining in HPV-independent carcinomas.^{15,28} These results support a strong association with HPV in Mozambican cohort, despite negative results for HPV testing. This data is also in keeping with previous work by our group on a large series of VSCC showing that, although in most cases p16 IHC and HPV PCR testing results were concordant (ie, both negative or both positive), in a small percentage of VSCC discordant p16/HPV testing results were observed. Interestingly, the subset of tumors showing p16 positive IHC staining but negative HPV PCR testing result shared marked similarities with the tumors positive for both p16 and HPV, in terms of mean age (younger patients) and histological distribution of the tumors (high percentage of basaloid/warty tumors), whereas the subset of tumors showing p16 negative IHC staining and positive HPV PCR testing result shared marked similarities with the tumors negative for both p16 and HPV, in terms of mean age (older patients) and histological distribution of the tumors (marked predominance of keratinizing tumors), indicating that p16 is more robust than HPV detection in formalin fixed, paraffin embedded tissues.⁴

Although most of the cases showing p53 IHC abnormal patterns of staining suggestive of mutation were HPV-independent VSCC, a small subset of HPV-associated tumors showed these abnormal patterns of p53 staining. This finding has already been reported in studies based on IHC, as well as in studies analyzing genetic mutations.^{4,15,16} Indeed, almost all the mutational differences between HPV-associated and HPV-independent VSCC are quantitative and not qualitative, as almost all mutations have been described in the two types of tumors, but with different frequencies.

In conclusion, the majority of VSCC in Mozambique, a country in South-Eastern Africa probably representative of the situation of many sub-Saharan African countries, are HPV-associated and arise in young women, which markedly contrasts with the predominance of HPV-independent VSCC affecting old women observed in Europe. This data may have important consequences for primary prevention policies of VSCC worldwide, and suggest that, whereas vaccination programs could prevent a small proportion of VSCC in many western countries, they can protect sub-Saharan African women of the vast majority of VSCC.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, Jaume Ordi, Natalia Rakislova, Marta del Pino and Carla Carrilho; methodology, Lorena Marimon, Silvia Alo's, Naiara Vega, Francisco M. Pérez; investigation Nuria Carreras-Dieguez, Carolina Manzotti, Ofelia Saúde, Laurina Chulo, Ricardina Rangeiro, Lucilia Lovane, Cesaltina Lorenzoni, Sherley Diaz-Mercedes, Inmaculada Ribera-Cortada, Esther Sanfeliu, Ricardo Lo'pez del Campo, Fabiola Fernandes, Maria Teresa Rodrigo-Calvo, Isabel Trias, Carla Carrilho, Natalia Rakislova and Jaume Ordi; data curation, Natalia Rakislova, Nuria Carreras-Dieguez, Jaume Ordi and Carla Carrilho; formal analysis, Marta del Pino; writing-original draft preparation, Jaume Ordi, Natalia Rakislova, Marta del Pino and Nuria Carreras-Dieguez; writing-review and editing, Ofelia Saúde, Carolina Manzotti, Laurina Chulo, Ricardina Rangeiro, Lucilia Lovane, Cesaltina Lorenzoni, Sherley Diaz-Mercedes, Inmaculada Ribera-Cortada, Esther Sanfeliu, Ricardo Lo'pez del Campo, Fabiola Fernandes, Isabel Trias, Lorena Marimon, Silvia Alo's, Naiara Vega, Francisco M. Pérez, Maria Teresa Rodrigo-Calvo, Nuria Carreras-Dieguez and Carla Carrilho; visualization, Jaume Ordi, Natalia Rakislova, Nuria Carreras-Dieguez and Marta del Pino. The work reported in the paper has been performed by the authors, unless clearly specified in the text.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Pathology and MCH Cancer Registry databases for helping to obtain the data and Calouste Gulbenkian Foundation, Portugal and partners (Camões—Institute of Cooperation and Language, Portugal; Millennium BCP Foundation, Portugal; and Millennium BIM, Mozambique), which allowed the implementation of MCH Cancer Registry under the project "Improving the diagnosis and treatment of oncological diseases in Mozambique." ISGlobal receives support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through the "Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019-2023" Program (CEX2018-000806-S), and support from the Generalitat de Catalunya through the CERCA Program.

FUNDING INFORMATION

Project PI17/00772 funded by Instituto de Salud Carlos III and co-funded by the European Union (ERDF) "A way to make Europe."

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the Ethics Committees of the Faculty of Medicine of Maputo Central Hospital (CIBS FM&HCM/071/2017) and Hospital Clinic of Barcelona (ref HCB/2020/1198).

ORCID

Natalia Rakislova  <https://orcid.org/0000-0001-5030-3526>

Carolina Manzotti  <https://orcid.org/0000-0002-0025-2318>

Marta del Pino  <https://orcid.org/0000-0003-2178-2403>

Carla Carrilho  <https://orcid.org/0000-0003-0208-7309>

Jaume Ordi  <https://orcid.org/0000-0002-4820-7954>

REFERENCES

1. Bruni, L.; Albero, G.; Serrano, B.; Mena, M.; Go´mez, D.; Mu˜oz, J.; Bosch, F.; de Sanjos´e, S.; 2019. ICO HPV information Centre ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. Summary report 17 June 2019.
2. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. Basaloid and warty carcinomas of the vulva: distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am J Surg Pathol*. 1993;17: 133-145. doi:10.1097/00000478-199302000-00005
3. Toki T, Kurman RJ, Park JS, Kessiss T, Daniel RW, Shah KV. Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Pathol*. 1991;10: 107-125.
4. Rakislova N, Clavero O, Alemany L, et al. Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: a study of 1,594 cases. *Int J Cancer*. 2017;141:2517-2527. doi:10.1002/ijc.31006
5. Otter S, Whitaker S, Chatterjee J, Stewart A. The human papillomavirus as a common pathogen in oropharyngeal, anal and cervical cancers. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2019;31:81-90. doi:10.1016/J.CLON.2018.10.004
6. Kortekaas KE, Bastiaannet E, van Doorn HC, et al. Vulvar cancer sub-classification by HPV and p53 status results in three clinically distinct subtypes. *Gynecol Oncol*. 2020;159:649-656. doi:10.1016/j.ygyno.2020.09.024
7. Hhn AK, Brambs CE, Hiller GGR, May D, Schmoedel E, Horn LC. 2020 WHO classification of female genital tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2021;81:1145-1153. doi:10.1055/A-1545-4279
8. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part a: renal, penile, and testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70:93-105. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.029
9. El-Naggar A. K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T., Sliotweg, P.J.; 2017, WHO classification of head and neck tumours.
10. de Sanjos´e S, Alemany L, Ordi J, et al. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer*. 2013;49:3450-3461. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.033
11. Cheng AS, Karnezis AN, Jordan S, Singh N, McAlpine JN, Gilks CB. p16 immunostaining allows for accurate subclassification of vulvar squamous cell carcinoma into HPV-associated and HPV-independent cases. *Int J Gynecol Pathol*. 2016;35:385-393. doi:10.1097/PGP.0000000000000263
12. Dwyer-Lindgren L, Cork MA, Sligar A, et al. Mapping HIV prevalence in sub-Saharan Africa between 2000 and 2017. *Nature*. 2019;570: 189-193. doi:10.1038/S41586-019-1200-9
13. Looker KJ, Rnn MM, Brock PM, et al. Evidence of synergistic relationships between HIV and human papillomavirus (HPV): systematic reviews and meta-analyses of longitudinal studies of HPV acquisition and clearance by HIV status, and of HIV acquisition by HPV status. *J. Int. AIDS Soc*. 2018;21(6):e25110. doi:10.1002/jia2.25110
14. Santos M, Landolfi S, Olivella A, et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:1347-1356.
15. Tessier-Cloutier B, Kortekaas KE, Thompson E, et al. Major p53 immunohistochemical patterns in in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod Pathol*. 2020;33:1595-1605. doi:10.1038/s41379-020-0524-1
16. Kortekaas KE, Solleveld-Westerink N, Tessier-Cloutier B, et al. Performance of the pattern based interpretation of p53 immunohistochemistry as a surrogate for TP53 mutations in vulvar squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2020;77:92-99. doi:10.1111/his.14109
17. Morhason-Bello IO, Baisley K, Pavon MA, et al. Prevalence and genotype specific concordance of oro-genital and anal human papillomavirus infections among sexually active Nigerian women. *Infect Agent Cancer*. 2021;16(1):59. doi:10.1186/s13027-021-00398-9
18. Men´endez C, Castellsagu´e X, Renom M, et al. Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women from a rural area of southern Mozambique. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010;2010:1-9. doi:10.1155/2010/609315
19. Parkin DM, Sitas F, Chirenje M, Stein L, Abratt R, Wabinga H. Part I: cancer in indigenous Africans—burden, distribution, and trends. *Lancet Oncol*. 2008;9:683-692. doi:10.1016/S1470-2045(08)70175-X
20. Parkin DM, Chingonzoh T, Vuma S, et al. Changes in the incidence of cancer in Bulawayo, Zimbabwe over a 50-year period. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021;30:867-873. doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-0669
21. Edna Omar V, Orvalho A, N´alia I, et al. Human papillomavirus prevalence and genotype distribution among young women and men in Maputo city, Mozambique. *BMJ Open*. 2017;7(7):e015653. doi:10.1136/BMJOPEN-2016-015653
22. Lorenzoni C, Vilajeliu A, Carrilho C, et al. Trends in cancer incidence in Maputo, Mozambique, 1991-2008. *PLoS One*. 2015;10:e0130469. doi:10.1371/journal.pone.0130469
23. Wilson ML, Fleming KA, Kuti MA, Looi LM, Lago N, Ru K. Access to pathology and laboratory medicine services: a crucial gap. *Lancet (London, England)*. 2018;391:1927-1938. doi:10.1016/S0140-6736(18)30458-6
24. Maueia C, Murahwa A, Manjate A, et al. Identification of the human papillomavirus genotypes, according to the human immunodeficiency virus status in a cohort of women from Maputo, Mozambique. *Viruses*. 2021;14(1):24. doi:10.3390/V14010024
25. Gonz´alez R, Munguambe K, Aponte JJ, et al. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a community-based survey. *HIV Med*. 2012;13:581-588. doi:10.1111/J.1468-1293.2012.01018.X
26. Letang E, Rakislova N, Martinez MJ, et al. Minimally invasive tissue sampling: a tool to guide efforts to reduce AIDS-related mortality in resource-limited settings. *Clin Infect Dis*. 2021;73((Suppl_5)):S343-S350.
27. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92: 1500-1510. doi:10.1093/JNCI/92.18.1500
28. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2007; 370:59-67. doi:10.1016/S0140-6736(07)61050-2

How to cite this article: Rakislova N, Carreras-Dieguez N, Manzotti C, et al. Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe. *Int J Cancer*. 2023;152(3):496-503. doi:10.1002/ijc.34314

Discusión

La presente tesis está compuesta por dos artículos que estudian las características etiopatogénicas de los carcinomas escamosos del pene y de la vulva en Mozambique y España respectivamente, destacando las diferencias de estos tumores entre ambas regiones.

En el primer estudio presentado proporcionamos información relevante en relación con la epidemiología del carcinoma escamoso de pene en el África subsahariana, una región geográfica en la que estos datos son especialmente escasos, dado que la mayor parte de la bibliografía publicada corresponde a series de países de renta alta [4,109].

Las dos series de carcinoma escamoso de pene incluidas en el estudio, una del Mozambique, un país del África subsahariana, situado en la región sur-oriental del continente, y la otra de España, un país del sur de Europa, muestran diferencias etiopatogénicas relevantes. Los estudios ponen de relieve la prevalencia extremadamente alta de carcinomas escamosos de pene asociados al VPH en Mozambique en comparación con la baja prevalencia de éstos en España. Considerando como VPH-asociados a todos aquellos carcinomas escamosos que mostraban sobreexpresión de p16 o ADN del VPH en el análisis por PCR, encontramos que más del 89 % de los carcinomas escamosos de pene de Mozambique, pero solo el 29 % de los de España, estaban asociados al VPH. Utilizando un escenario más restrictivo para asumir un tumor como relacionado con el VPH, es decir, exigiendo tanto la sobreexpresión inmunohistoquímica de p16 como la identificación de ADN de VPH por PCR, la proporción de estos tumores en Mozambique seguía siendo extremadamente elevada (71,4 %), mientras que en España disminuyó hasta el 17,6 %.

Al realizar el estudio de los genotipos del virus del papiloma asociados a estos tumores hallamos que el VPH16 fue el tipo de VPH más frecuentemente identificado en ambos sitios (64 % y 60 % de los tumores relacionados con el VPH de Mozambique y España,

respectivamente), resultados similares a los reportados en diversos estudios [4,109], que muestran que, VPH16 es el virus más frecuentemente asociado a cáncer en todos los órganos en los que VPH está involucrado en la carcinogénesis, e independientemente de la región geográfica. No se hallaron diferencias en cuanto a la distribución de otros tipos de VPH entre ambos países. La única diferencia detectada fue una prevalencia de infección por cepas múltiples de VPH ligeramente superior en Mozambique, en comparación con la observada en España.

Los resultados de nuestra cohorte española coinciden con la mayoría de los estudios publicados de países de renta alta. En estas regiones, el carcinoma escamoso de pene es típicamente una enfermedad de hombres mayores, y una proporción significativa de estos tumores surge independientemente del VPH, frecuentemente en el contexto de afecciones inflamatorias crónicas de la piel del pene, como el liquen escleroso y el liquen simple crónico [4,110,111]. Por el contrario, la información procedente de sitios de rentas bajas es muy escasa [112]. Los pocos datos existentes sugieren que el carcinoma escamoso de pene en estas regiones puede tener un contexto epidemiológico distintivo, y que la mayoría de los tumores surgirían por una vía asociada al VPH [113].

Esta alta prevalencia de tumores asociados a la infección por VPH se pone en relación con la alta prevalencia de infecciones por VPH reportada en muchos países de renta baja y media, particularmente en la región del Caribe y en el África sur-oriental, zona en la que está situada Mozambique. En efecto, la prevalencia de la infección por VPH en Mozambique alcanza en los estudios publicados el 63 % [114]. Dado que los tumores asociados al VPH tienden a afectar a individuos más jóvenes, los pacientes de Mozambique eran casi dos décadas menores en promedio que los pacientes de España, un patrón observado también en los carcinomas de células escamosas de vulva [52].

Aunque la alta prevalencia de infecciones por VPH debería considerarse el principal

factor de la alta prevalencia de carcinomas escamosos del pene asociados a este virus en la cohorte mozambiqueña, también se ha sugerido la elevada prevalencia de VIH en Mozambique [115] como un factor importante para el aumento de estos carcinomas asociados al VPH, al igual que sucedería en otros países subsaharianos [116]. Un estudio comunitario realizado en un distrito rural de la provincia de Maputo (Mozambique) mostró una prevalencia de VIH del 37 % en hombres de entre 28 y 47 años [115]. Se ha observado un alto riesgo de desarrollar cánceres relacionados con el VPH en personas que viven con el VIH [117], y los dos virus (VPH y VIH tipo 1) han sido clasificados como carcinógenos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer (IARC)*) [118]. No obstante, aunque la asociación entre el VIH y el cáncer de cérvix está bien establecida [119], la relación entre el carcinoma escamoso de pene asociado al VPH y el VIH no ha sido aún estudiada. Curiosamente, el 75 % de los pacientes mozambiqueños de los que se disponía de datos clínicos eran VIH positivos. En cambio, la prevalencia de pacientes VIH positivos en la serie española fue de solo el 1,9 %. Por último, el acceso limitado al sistema de salud también podría contribuir a esta elevada incidencia de infección por VIH, ya que una gran parte de la población de Mozambique vive en zonas rurales donde el acceso a la atención de la salud es deficiente.

Con respecto a las características histológicas de las neoplasias llama la atención que, aunque el 90 % de los tumores asociados al VPH eran de tipos basaloídes, condilomatosos, mixtos basaloídes/ condilomatosos, o linfopitelioma-like, los tipos de carcinoma escamoso de pene considerados como tumores relacionados con el VPH siguiendo la clasificación de la OMS [120,121], el 10 % de estos tumores en nuestra serie eran del tipo usual. Del mismo modo, mientras que el 85 % de los tumores independientes del VPH eran del tipo usual o verrucoso, se identificó un 15 % de tumores con morfología basaloide, condilomatosa o mixtos de tipo condilomatoso/basaloide, es decir, los tipos histológicos considerados en esta clasificación como relacionados con el

VPH. En el mayor estudio publicado sobre tumores del pene se han notificado resultados similares [4]. Estos hallazgos sugieren que el diagnóstico basado exclusivamente en criterios morfológicos puede inducir a error en una proporción pequeña pero significativa de tumores e indican que debería requerirse el estudio inmunohistoquímico para p16 o estudio molecular del ADN del VPH para clasificar adecuadamente el carcinoma escamoso de pene como asociado o independiente del VPH. A este respecto, nuestro grupo ya reportó que una pequeña proporción de lesiones precursoras intraepiteliales VPH-independientes puede ser indistinguible de los precursores asociados al VPH [76]. Esta superposición morfológica entre tumores asociados e independientes del VPH es un fenómeno bien conocido en los tumores de vulva [50] y en los de cabeza y cuello, y la clasificación según la OMS de ambos tipos de neoplasias subraya la necesidad de realizar pruebas inmunohistoquímicas para p16 o estudio de ADN del VPH para clasificar adecuadamente estos tumores debido al mejor pronóstico de ambos tipos de neoplasias en comparación con los tumores independientes del VPH [44,122]. Creciente evidencia sugiere que este mejor comportamiento de los tumores relacionados con el VPH se aplica también al carcinoma escamoso de pene [123,124] subrayando la necesidad de realizar estudios auxiliares para clasificar adecuadamente estas neoplasias. Sin embargo, los estudios complementarios para detectar el VPH en estos tumores probablemente no serían necesarios en los países subsaharianos teniendo en cuenta que allí la gran mayoría de los carcinomas escamosos de pene están asociados al VPH, siendo los tumores VPH-independientes extremadamente infrecuentes y las capacidades de los laboratorios escasas [125].

Resulta interesante que con el estudio inmunohistoquímico para p53 se identificaron patrones anormales en un alto porcentaje de los carcinomas escamosos de pene independientes del VPH, pero también en un pequeño porcentaje de tumores asociados al virus, un fenómeno ya notificado en estudios basados en inmunohistoquímica, así como en estudios que analizaron las mutaciones en *TP53* [25,126–128].

Un subgrupo de tumores mostró resultados discrepantes entre la inmunohistoquímica de p16 y el estudio de ADN del VPH. Es difícil extraer conclusiones sobre el significado de estos hallazgos y sobre si estos casos están o no relacionados con el VPH con los datos del presente estudio. Recientemente se ha propuesto que, además de la identificación del ADN del VPH, también debería exigirse un segundo biomarcador, como p16 o el ARNm E6, para considerar que un tumor está etiológicamente asociado con el VPH [4]. Por otro lado, los estudios realizados en carcinomas de células escamosas de vulva sugieren que el estudio inmunohistoquímico para p16 sería más fiable que los test de detección del ADN del VPH que utilizan material fijado de formol e incluido en parafina [50].

En conclusión, la mayoría de los carcinomas escamosos de pene de Mozambique, un país del sudeste de África, que probablemente refleja el panorama epidemiológico de muchos países del África subsahariana, están asociados al VPH y surgen en hombres jóvenes. En cambio, la mayoría de los carcinomas escamosos de pene diagnosticados en Europa son independientes del VPH y afectan a hombres mayores. Estos datos sugieren que la extensión de los programas de vacunación contra el VPH a los varones en países de baja renta podría, además de los beneficios conocidos sobre el cáncer de cérvix, reducir una proporción significativa de los casos de cánceres de pene.

El segundo estudio presentado en esta tesis proporciona datos relevantes sobre la epidemiología del carcinoma escamoso de vulva en el África subsahariana, una región geográfica en la que esta información es casi inexistente y la compara con la de España. Nuestra serie pone de relieve la prevalencia excepcionalmente elevada del VPH en los carcinomas escamosos de la vulva en Mozambique y confirma que existen marcadas diferencias etiopatogénicas entre las neoplasias del África subsahariana y las de Europa.

De esta manera, más del 95 % de carcinomas escamosos de vulva de Mozambique, pero solo el 19 % de los de España, estaban asociados al VPH. De acuerdo con estas diferencias etiopatogénicas, la presentación clínica también fue notablemente diferente, siendo las pacientes de España casi tres décadas mayores en promedio que las de Mozambique.

Los hallazgos observados en nuestra serie de España concuerdan con la mayoría de las series publicadas de países de renta alta [51,56,59,90] en los que el carcinoma escamoso de vulva es una enfermedad típicamente de mujeres de edad avanzada que surge independiente del VPH, generalmente en asociación con lesiones inflamatorias y reactivas crónicas de la piel vulvar, como el liquen escleroso y el liquen simple crónico.

En cambio, la serie del África subsahariana mostró un patrón epidemiológico completamente diferente, con casi todos los tumores originados a través de una vía asociada al VPH. Se ha notificado una alta prevalencia de infecciones anogenitales por VPH en mujeres del África Subsahariana [129,130]. De hecho, el cáncer de cérvix uterino, el tumor maligno más frecuentemente asociado al VPH, es el cáncer más frecuente en mujeres del África subsahariana, con la mayor incidencia en África oriental y África del Sur [131–133] y una prevalencia extremadamente alta reportada por nuestro grupo en el sur de Mozambique [116]. Nuestros resultados muestran que, aunque la clasificación actual de la OMS de 2020 separa los carcinomas escamosos de vulva en tumores asociados o independientes del VPH y recomienda el uso de pruebas del VPH y/o de inmunohistoquímica para p16 para una clasificación adecuada, este requisito, al igual que ocurre con las neoplasias del pene, podría considerarse innecesario en muchos países subsaharianos, donde el número de tumores independientes del VPH es extremadamente bajo y los recursos y las capacidades de los laboratorios son, en general, particularmente limitados [125].

Además de la alta prevalencia de la infección por VPH, se ha propuesto que la también

alta prevalencia de infección por VIH en Mozambique [114] sea la explicación más probable del aumento de la incidencia en el cáncer de cérvix uterino observado en este país y en varios países subsaharianos [116]. Según el *UNAIDS Global Report*, la prevalencia del VIH en Mozambique fue del 45 % en las mujeres de entre 28 y 47 años en un estudio comunitario en un distrito rural de la provincia de Maputo [115], con un elevado número de pacientes que no reciben tratamiento antirretroviral y que se presentan al momento del diagnóstico con SIDA. Las personas que viven con VIH presentan un alto riesgo de desarrollar cánceres relacionados con el VPH [117] y tanto VPH y VIH tipo 1 son considerados como carcinógenos por la IARC [134]. De todos modos, en contraste con la asociación relativamente bien conocida entre VIH y cáncer cervical, faltan estudios que establezcan el riesgo de desarrollar carcinoma escamoso de vulva en personas que viven con infección por VIH. Cabe destacar que el 78 % de las pacientes de Mozambique en las que se disponía de la información eran VIH positivas, lo que contrasta con el 0 % de pacientes VIH positivas en la cohorte española.

Los resultados de nuestro estudio, que mostraron una proporción relativamente elevada de tumores fuertemente positivos para p16, pero negativos para el ADN del VPH, sugieren que la inmunohistoquímica para p16 es más sólida y fiable que la detección de ADN del VPH en material fijado en parafina, que es el tipo de muestra normalmente disponible para muchos tumores sólidos, como el carcinoma escamoso de vulva [50]. El hallazgo inmunohistoquímico de p53 con patrón *wild type*, el patrón habitual en carcinomas escamosos de vulva asociados al VPH [64,90], en todos los tumores de Mozambique contrasta con la elevada proporción de carcinomas escamosos de vulva con tinción anómala en la inmunohistoquímica para p53 en España, lo más común en carcinomas independientes del VPH [64,90,134]. Estos resultados respaldan una fuerte asociación con el VPH en la cohorte mozambiqueña, a pesar de los resultados negativos en las pruebas del VPH. Estos datos concuerdan también con los trabajos anteriores de nuestro grupo sobre una amplia serie de carcinomas escamosos de vulva, que muestran

que, aunque en la mayoría de los casos los resultados de las pruebas de inmunohistoquímica para p16 y PCR para VPH eran concordantes (es decir, ambos negativos o ambos positivos), en un pequeño porcentaje de carcinomas escamosos de vulva se observaban resultados discordantes en el estudio p16/VPH.

Resulta interesante que el subconjunto de tumores que mostraban tinción inmunohistoquímica positiva para p16, pero resultado negativo de la prueba PCR del VPH, compartía marcadas similitudes con los tumores positivos tanto para p16 como para el VPH, en términos de edad media (pacientes más jóvenes) y características histológicas de los tumores (alto porcentaje de tumores basaloides/condilomatosos). Por su parte, el subconjunto de tumores que mostraban tinción negativa para p16 y resultado positivo en las pruebas PCR del VPH compartían similitudes marcadas con los tumores negativos tanto para p16 como para el VPH, en términos de edad media (pacientes mayores) y distribución histológica de los tumores (marcada preponderancia de tumores queratinizantes), lo que indica que la p16 es más robusta que la detección del VPH en tejido fijado en formol y embebido en parafina [50].

Aunque la mayoría de los casos que mostraban patrones inmunohistoquímicos anormales para p53, sugerentes de mutación, eran carcinomas escamosos de vulva independientes del VPH, un pequeño subconjunto de tumores asociados al virus mostraba patrones anormales de p53. Estos hallazgos ya se habían comunicado en estudios basados en inmunohistoquímica, así como en estudios de análisis de mutaciones genéticas [50,60,64]. De hecho, casi todas las diferencias mutacionales entre el carcinoma escamoso de vulva asociado al VPH y el VPH-independiente son cuantitativas y no cualitativas, ya que casi todas las mutaciones se han descrito en los dos tipos de tumores, pero con frecuencias diferentes.

En conclusión, la mayoría de los carcinomas escamosos de vulva de Mozambique, un país

del sudeste africano probablemente representativo de la situación de muchos países del África subsahariana, está asociada al VPH y se produce en mujeres jóvenes, lo que contrasta notablemente con el predominio de carcinomas escamosos de vulva independientes del VPH que afecta a mujeres mayores observado en España.

Estos datos pueden tener importantes consecuencias para las políticas de prevención primaria del carcinoma escamoso de vulva en todo el mundo, y sugieren que, si bien los programas de vacunación podrían impedir una pequeña proporción de carcinomas escamosos de vulva en muchos países occidentales, pueden proteger a las mujeres subsaharianas de la gran mayoría de estos tumores.

Considerando los hallazgos de ambos artículos vemos que los cánceres de vulva y pene presentan características etiopatogénicas similares entre sí y que en cambio ambos muestran diferencias marcadas teniendo en cuenta si surgen en pacientes de países de alta o baja renta.

Los casos de carcinomas escamosos, tanto de pene como de vulva, de pacientes de Mozambique, se relacionan en su gran mayoría con el VPH y se diagnostican en pacientes entre dos y tres décadas más jóvenes que en España, en donde la mayoría de los casos son VPH-independientes.

En ambos sitios los carcinomas VPH-asociados mostraron mayoritariamente resultados positivos para p16 y para ADN del VPH por PCR. Aún y así una proporción de ellos presentaba resultados discordantes entre estas dos técnicas. En estos casos el resultado de la p16 parece más eficaz en la detección de las neoplasias asociadas VPH sobre muestras fijadas en formol y conservadas en parafina, dado que estos casos compartían las características histológicas (tumores con patrón basaloide/condilomatoso),

inmunohistoquímicas (patrón wild-type de p53) y el rango de edad con los casos que eran positivos para p16 y para ADN del virus por PCR.

Estos hallazgos hacen suponer que la aplicación de una buena política de vacunación contra el VPH en el África Subsahariana podría prevenir la inmensa mayoría de los carcinomas escamosos de vulva y pene en dicha región.

Los hallazgos de estos estudios son marcadamente consistentes entre sí y amplían los conocimientos sobre el tema existentes en la bibliografía previa, aún y así presenta alguna limitación relacionada con la cantidad de pacientes incluidos en los estudios, sobre todo en las muestras de Mozambique, esto es debido en primer lugar a que ambas neoplasias son raras y su incidencia es relativamente baja y a la dificultad de recolección de casos. Aún y así se incluyeron todos los casos diagnosticados en hospitales de referencia durante un período de aproximadamente 2 años. Próximas líneas de estudio podrían intentar ampliar el número de casos considerando la posibilidad de incluir otros centros/ países en el estudio y establecer colaboraciones y registros internacionales para recopilar datos sobre los carcinomas escamosos de pene y vulva, mejorando la capacidad de realizar estudios a gran escala y ensayos clínicos.

Por otro lado, futuras líneas de investigación en relación con estas patologías deberían intentar:

- Evaluar el impacto real de los programas de vacunación contra el VPH sobre la incidencia de estas neoplasias.
- Establecer el riesgo de desarrollar carcinomas escamosos de vulva o pene en aquellas personas que viven con VIH y su relación con el VPH.
- Identificar mutaciones genéticas y vías moleculares involucradas en el desarrollo y progresión de estos carcinomas para encontrar posibles dianas terapéuticas y marcadores para su detección temprana.
- Evaluar el papel de la inmunoterapia y tratamientos dirigidos para estos cánceres,

así como estudiar el microambiente tumoral para identificar a los pacientes que puedan beneficiarse de estos enfoques.

- Desarrollar y validar métodos no invasivos para la detección temprana y el cribado, particularmente para poblaciones de alto riesgo, para diagnosticar estos carcinomas en etapas más tempranas y tratables con menores secuelas físicas y psicológicas.

Conclusiones

Como resultado de la investigación realizada y a partir del análisis exhaustivo de la evidencia recopilada en los artículos que forman esta tesis a continuación se enumeran las principales conclusiones:

1. Se observaron diferencias etiopatogénicas significativas entre los carcinomas escamosos de pene de Mozambique y España, con una prevalencia notablemente alta de tumores asociados al VPH en Mozambique (89%) y una prevalencia relativamente baja en España (29%) (estudio número 1).
2. Entre los carcinomas de pene asociados a virus del papiloma humano, VPH16 fue el tipo de VPH más frecuentemente identificado (64% de los tumores de Mozambique, y 60% de España). Se evidenció un número mayor de infecciones por múltiples tipos de VPH en los tumores de Mozambique (estudio número 1).
3. Los pacientes con cáncer de pene en Mozambique eran casi dos décadas más jóvenes que los de España (edad media 50 vs. 69 años, respectivamente) (estudio número 1).
4. Se observaron diferencias etiopatogénicas significativas entre los carcinomas escamosos de vulva de Mozambique y España, con una prevalencia extraordinariamente alta de tumores asociados al VPH en Mozambique (97%) y una prevalencia muy baja en España (19%) (estudio número 2).
5. Entre los carcinomas de vulva asociados a virus del papiloma humano, VPH16 fue el tipo de VPH más frecuentemente identificado (43% de los tumores de Mozambique y 50% de España) sin hallarse diferencias significativas entre ambas cohortes en cuanto a casos con infecciones por múltiples genotipos de VPH (estudio número 2).
6. Las pacientes con cáncer de vulva en Mozambique eran casi tres décadas más jóvenes que las de España (edad media 45 vs. 72 años, respectivamente) (estudio número 2).
7. La correlación entre la determinación molecular del ADN de VPH y la expresión de p16 fue muy buena tanto para los tumores de pene y vulva de Mozambique como para los de España (estudios números 1 y 2).

8. Un porcentaje elevado de los tumores de pene y vulva VPH-independientes presentaron un patrón de tinción de p53 anormal, sugestivo de mutación del gen *TP53* (estudios números 1 y 2).
9. En conclusión, los datos obtenidos con estos estudios pueden tener consecuencias importantes para la prevención primaria de cáncer de pene y vulva en el mundo: la vacunación contra el VPH puede tener un impacto muy alto en cuanto a reducción global de incidencia de cáncer de pene y vulva en África Subsahariana, y un impacto bajo en Europa (estudios números 1 y 2).

Bibliografía

- [1] Moch H, Amin MB. WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 8 Tumors of the penis and scrotum. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Urinary and Male Genital Tumours. 5th ed., Lyon, France. International Agency for Research on Cancer; 2022.
- [2] Emmanuel A, Nettleton J, Watkin N, Berney DM. The molecular pathogenesis of penile carcinoma-current developments and understanding. *Virchows Arch.* 2019 Oct;475(4):397-405. doi: 10.1007/s00428-019-02607-8. Epub 2019 Jun 26. PMID: 31243533..
- [3] Thomas A, Necchi A, Muneer A, Tobias-Machado M, Tran ATH, Van Rompuy AS, et al. Penile cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Feb 11;7(1):11. doi: 10.1038/s41572-021-00246-5. PMID: 33574340.
- [4] Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol* 2016;69:953–61. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.12.007>.
- [5] Longpre MJ, Lange PH, Kwon JS, Black PC. Penile carcinoma: lessons learned from vulvar carcinoma. *J Urol.* 2013 Jan;189(1):17-24. doi: 10.1016/j.juro.2012.08.082. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23158472.
- [6] Krusturup D, Jensen HL, Van Den Brule AJC, Frisch M. Histological characteristics of human papilloma-virus-positive and -negative invasive and in situ squamous cell tumours of the penis. *Int J Exp Pathol* 2009;90:182–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00636.x>.
- [7] Cubilla AL, Velazquez EF, Amin MB, Epstein J, Berney DM, Corbishley CM. The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. *Histopathology* 2018;72(6):893–904. <https://doi.org/10.1111/HIS.13429>.
- [8] Menon S, Moch H, Berney DM, Cree IA, Srigley JR, Tsuzuki T, et al. WHO 2022 classification of penile and scrotal cancers: updates and evolution. *Histopathology* 2023;82:508–20. <https://doi.org/10.1111/his.14824>.
- [9] Chaux A, Pfannl R, Rodríguez IM, Barreto JE, Velazquez EF, Lezcano C, et al. Distinctive immunohistochemical profile of penile intraepithelial lesions: a study of 74 cases. *Am J Surg Pathol* 2011;35:553–62.
- [10] Chaux A, Velazquez EF, Amin A, Soskin A, Pfannl R, Rodríguez IM, et al. Distribution and characterization of subtypes of penile intraepithelial neoplasia and their association with invasive carcinomas: A pathological study of 139 lesions in 121 patients. *Hum Pathol* 2012;43:1020–7. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.07.025>.
- [11] Velazquez EF, Chaux A, Cubilla AL. Histologic classification of penile intraepithelial neoplasia. *Semin Diagn Pathol* 2012;29:96–102. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2011.08.009>.
- [12] Cañete-Portillo S, Sanchez DF, Fernández-Nestosa MJ, Piris A, Zarza P, Oneto S, et al. Continuous Spatial Sequences of Lichen Sclerosus, Penile Intraepithelial Neoplasia, and Invasive Carcinomas: A Study of 109 Cases. *Int J Surg Pathol* 2019;27:477–82. <https://doi.org/10.1177/1066896918820960>

- [13] Canete-Portillo S, Velazquez EF, Kristiansen G, Egevad L, Grignon D, Chaux A, et al. Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers V: Recommendations on the Use of Immunohistochemical and Molecular Biomarkers in Penile Cancer. *Am J Surg Pathol*. 2020 Jul;44(7):e80-e86. doi: 10.1097/PAS.0000000000001477. PMID: 32235153.
- [14] Hoekstra RJ, Trip EJ, ten Kate FJW, Horenblas S, Lock MT. Penile intraepithelial neoplasia: Nomenclature, incidence and progression to malignancy in the Netherlands. *Int J Urol*. 2019 Mar;26(3):353-357. doi: 10.1111/iju.13871. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30508877..
- [15] Depasquale I, Park AJ, Bracka A. The treatment of balanitis xerotica obliterans. *BJU Int* 2000;86:459–65. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2000.00772.x>.
- [16] Arya M, Kalsi J, Kelly J, Muneer A. Malignant and premalignant lesions of the penis. *BMJ (Online)* 2013;346. <https://doi.org/10.1136/bmj.f1149>.
- [17] Barbagli G, Palminteri E, Mirri F, Guazzoni G, Turini D, Lazzeri M. Penile carcinoma in patients with genital lichen sclerosus: A multicenter survey. *J Urol*. 2006 Apr;175(4):1359-63. doi: 10.1016/S0022-5347(05)00735-4. PMID: 16515998.
- [18] Kravvas G, Ge L, Ng J, Shim TN, Doiron PR, Watchorn R, et al. The management of penile intraepithelial neoplasia (PeIN): clinical and histological features and treatment of 345 patients and a review of the literature. *J Dermatolog Treat*. 2022 Mar;33(2):1047-1062. doi: 10.1080/09546634.2020.1800574. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32705920.
- [19] Soskin A, Vieillefond A, Carlotti A, Plantier F, Chaux A, Ayala G, et al. Warty/basaloid penile intraepithelial neoplasia is more prevalent than differentiated penile intraepithelial neoplasia in nonendemic regions for penile cancer when compared with endemic areas: A comparative study between pathologic series from Paris and Paraguay. *Hum Pathol*. 2012 Feb;43(2):190-6. doi: 10.1016/j.humpath.2011.04.014. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21835427.
- [20] Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncol*. 2007 May;8(5):420-9. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70137-7. PMID: 17466899.
- [21] Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, Ayala G, Cubilla AL. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. *Urology*. 2010 Aug;76(2 Suppl 1):S7-S14. doi: 10.1016/j.urology.2010.02.038. PMID: 20691888.
- [22] Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med Microbiol Immunol* 2004;193:35–44. <https://doi.org/10.1007/s00430-003-0181-2>.
- [23] Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, Gallee MPW, Raaphorst FM, von Knebel Doeberitz M, et al. Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. *J Pathol*. 2003 Sep;201(1):109-18. doi: 10.1002/path.1394. PMID: 12950023.

- [24] Golijanin D, Tan J-Y, Kazior A, Cohen EG, Russo P, Dalbagni G, et al. Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Are Overexpressed in Squamous Cell Carcinoma of the Penis. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 1;10(3):1024-31. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-1032-3. PMID: 14871981.
- [25] Feber A, Worth DC, Chakravarthy A, De Winter P, Shah K, Arya M, et al. CSN1 somatic mutations in penile squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2016;76:4720–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3134>.
- [26] Chahoud J, Gleber-Netto FO, McCormick BZ, Rao P, Lu X, Guo M, et al. Whole-exome sequencing in penile squamous cell carcinoma uncovers novel prognostic categorization and drug targets similar to head and neck squamous cell carcinoma A C. *Clinical Cancer Research* 2021;27:2560–70. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4004>.
- [27] Chahoud J, Kohli M, Spiess PE. Management of Advanced Penile Cancer. *Mayo Clin Proc* 2021;96:720–32. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.06.031>.
- [28] Iorga L, Marcu R, Diaconu C, Stanescu A, Stoian A, Mischianu D, et al. Penile carcinoma and HPV infection (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Jul;20(1):91-96. doi: 10.3892/etm.2019.8181. Epub 2019 Nov 11. PMID: 32518604; PMCID: PMC7273896.
- [29] Sonpavde G, Pagliaro LC, Buonerba C, Dorff TB, Lee RJ, Di Lorenzo G. Penile cancer: Current therapy and future directions. *Ann Oncol*. 2013 May;24(5):1179-89. doi: 10.1093/annonc/mds635. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23293117; PMCID: PMC4047287.
- [30] Amin M, Edge S, Greene F, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Switzerland: Springer Cham; 2017.
- [31] Sanchez DF, Fernandez-Nestosa MJ, Cañete-Portillo S, Cubilla AL. Evolving insights into penile cancer pathology and the eighth edition of the AJCC TNM staging system. *Urol Oncol*. 2022 Jun;40(6):215-222. doi: 10.1016/j.urolonc.2020.09.010. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33008752.
- [32] Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *Eur Urol* 2018;73:560–9. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.12.018>.
- [33] Hakenberg OW, Dräger DL, Erbersdobler A, Naumann CM, Jünemann KP, Protzel C. The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer. *Dtsch Arztebl Int* 2018;115:646–52. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0646>.
- [34] Nicolai N, Sangalli LM, Necchi A, Giannatempo P, Paganoni AM, Colecchia M, et al. A Combination of Cisplatin and 5-Fluorouracil With a Taxane in Patients Who Underwent Lymph Node Dissection for Nodal Metastases From Squamous Cell Carcinoma of the Penis: Treatment Outcome and Survival Analyses in Neoadjuvant and Adjuvant Settings. *Clin Genitourin Cancer* 2016;14:323–30. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.07.009>.

- [35] Brouwer OR, Albersen M, Parnham A, Protzel C, Pettaway CA, Ayres B, et al. European Association of Urology-American Society of Clinical Oncology Collaborative Guideline on Penile Cancer: 2023 Update. *Eur Urol* 2023;83:548–60. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2023.02.027>.
- [36] Mahesan T, Hegarty PK, Watkin NA. Advances in Penile-Preserving Surgical Approaches in the Management of Penile Tumors. *Urol Clin North Am*. 2016 Nov;43(4):427-434. doi: 10.1016/j.ucl.2016.06.004. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27717429.
- [37] Shabbir M, Muneer A, Kalsi J, Shukla CJ, Zacharakis E, Garaffa G, et al. Glans resurfacing for the treatment of carcinoma in situ of the penis: Surgical technique and outcomes. *Eur Urol* 2011;59:142–7. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.09.039>.
- [38] Sakalis VI, Campi R, Barreto L, Perdomo HG, Greco I, Zapala Ł, et al. What Is the Most Effective Management of the Primary Tumor in Men with Invasive Penile Cancer: A Systematic Review of the Available Treatment Options and Their Outcomes. *Eur Urol Open Sci* 2022;40:58–94. <https://doi.org/10.1016/j.euros.2022.04.002>.
- [39] Sri D, Sujenthiran A, Lam W, Minter J, Tinwell BE, Corbishley CM, et al. A study into the association between local recurrence rates and surgical resection margins in organ-sparing surgery for penile squamous cell cancer. *BJU Int* 2018;122:576–82. <https://doi.org/10.1111/bju.14222>.
- [40] Flaig TW, Spiess PE, Chair V, Abern M, Agarwal N, Bangs R, et al. NCCN Guidelines Version 1.2023 Penile Cancer Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures. 2022.
- [41] Joshi VB, Chadha J, Chahoud J. Penile cancer: Updates in systemic therapy. *Asian J Urol* 2022;9:374–88. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2022.03.006>.
- [42] International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Globocan. IARC Press <https://GcolarcFr/> 2023. <https://gco.iarc.fr/>
- [43] Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA. Trends in the Incidence of Invasive and In Situ Vulvar Carcinoma. *Obstet Gynecol* 2006;107:1018–22. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000210268.57527.a1>.
- [44] James Derek B, Lora Hedrick E, C. Blake G, C. Simon H, Pei H. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. WHO Classification of Tumors. Editorial Board. Female genital tumours. 5th ed., Lyon, France.: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- [45] Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Arbyn M. Geographic and temporal variations in the incidence of vulvar and vaginal cancers. *Int J Cancer*. 2020;147:2764–71. <https://doi.org/10.1002/ijc.33055>.
- [46] Oonk MHM, Planchamp F, Baldwin P, Mahner S, Mirza MR, Fischerová D, Creutzberg CL, Guillot E, Garganese G, Lax S, Redondo A, Sturdza A, Taylor A, Ulrikh E, Vandecaveye V, van der Zee A, Wölber L, Zach D, Zannoni GF, Zapardiel I. European Society of Gynaecological Oncology Guidelines for the

- Management of Patients with Vulvar Cancer - Update 2023. *Int J Gynecol Cancer*. 2023 Jul 3;33(7):1023-1043. doi: 10.1136/ijgc-2023-004486. PMID: 37369376; PMCID: PMC10359596.
- [47] Abu-Rustum NR, Yashar CM, Arend R, Barber E, Bradley K, Brooks R, et al. Vulvar Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2024 Mar;22(2):117-135. doi: 10.6004/jnccn.2024.0013. PMID: 38503056.
- [48] Sobočan M, Bračič S, Knez J, Takač I, Haybaeck J. The communication between the PI3K/AKT/mTOR pathway and Y-box binding protein-1 in gynecological cancer. *Cancers (Basel)* 2020 Jan 14;12(1):205. doi: 10.3390/cancers12010205. PMID: 31947591; PMCID: PMC7017275.
- [49] Watkins JC, Howitt BE, Horowitz NS, Ritterhouse LL, Dong F, Macconail LE, et al. Differentiated exophytic vulvar intraepithelial lesions are genetically distinct from keratinizing squamous cell carcinomas and contain mutations in PIK3CA. *Mod Pathol*. 2017 Mar;30(3):448-458. doi: 10.1038/modpathol.2016.187. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27834349.
- [50] Rakislova N, Clavero O, Alemany L, Saco A, Quirós B, Lloveras B, et al. Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: A study of 1,594 cases. *Int J Cancer* 2017;141:2517–27. <https://doi.org/10.1002/ijc.31006>.
- [51] de Sanjosé S, Alemany L, Ordi J, Tous S, Alejo M, Bigby S, et al. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer* 2013;49:3450–61. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2013.06.033>.
- [52] Rakislova N, Carreras-Dieguez N, Manzotti C, Saúde O, del Pino M, Chulo L, et al. Differential etiopathogenic features of vulvar squamous cell carcinomas in sub-Saharan Africa and Europe. *Int J Cancer* 2023;152:496–503. <https://doi.org/10.1002/ijc.34314>.
- [53] Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2013;62:161–75. <https://doi.org/10.1111/HIS.12034>.
- [54] Alonso I, Felix A, Torné A, Fusté V, Del Pino M, Castillo P, et al. Human papillomavirus as a favorable prognostic biomarker in squamous cell carcinomas of the vagina. *Gynecol Oncol* 2012;125:194–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.12.449>.
- [55] Alonso I, Fusté V, Del Pino M, Castillo P, Torné A, Fusté P, et al. Does human papillomavirus infection imply a different prognosis in vulvar squamous cell carcinoma? *Gynecol Oncol* 2011;122:509–14. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.05.016>.
- [56] Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suárez H, et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1347–56.
- [57] Tavassoli F, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. vol. 4. 3rd ed. Lyon: Lyon: IARC publications; 2003.
- [58] McAlpine JN, Leung SCY, Cheng A, Miller D, Talhouk A, Gilks CB, et al. Human papillomavirus (HPV)-independent vulvar squamous cell carcinoma has a worse prognosis than HPV-associated

- disease: a retrospective cohort study. *Histopathology* 2017;71:238–46. <https://doi.org/10.1111/his.13205>.
- [59] Kortekaas KE, Bastiaannet E, van Doorn HC, de Vos van Steenwijk PJ, Ewing-Graham PC, Creutzberg CL, et al. Vulvar cancer subclassification by HPV and p53 status results in three clinically distinct subtypes. *Gynecol Oncol* 2020;159:649–56. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.09.024>.
- [60] Kortekaas K, Solleveld-Westerink N, Tessier-Cloutier B, Rutten T, Poelgeest M, Gilks C, et al. Performance of the pattern-based interpretation of p53 immunohistochemistry as a surrogate for TP53 mutations in vulvar squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2020;77:92–9. <https://doi.org/10.1111/HIS.14109>.
- [61] Nooij LS, Ter Haar NT, Ruano D, Rakislova N, Van Wezel T, Smit VTHBM, et al. Genomic characterization of vulvar (pre)cancers identifies distinct molecular subtypes with prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 2017 Nov 15;23(22):6781-6789. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1302. Epub 2017 Sep 12. PMID: 28899974.
- [62] Nascimento AF, Granter SR, Cviko A, Yuan L, Hecht JL, Crum CP. Vulvar Acanthosis With Altered Differentiation A Precursor to Verrucous Carcinoma? *Am J Surg Pathol*. 2004 May;28(5):638-43. doi: 10.1097/00000478-200405000-00012. PMID: 15105653.
- [63] Rakislova N, Alemany L, Clavero O, Saco A, Torné A, Del Pino M, et al. P53 immunohistochemical patterns in HPV- independent squamous cell carcinomas of the vulva and the associated skin lesions: A study of 779 cases. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21218091>.
- [64] Tessier-Cloutier B, Kortekaas KE, Thompson E, Pors J, Chen J, Ho J, et al. Major p53 immunohistochemical patterns in in situ and invasive squamous cell carcinomas of the vulva and correlation with TP53 mutation status. *Mod Pathol*. 2020 Aug;33(8):1595-1605. doi: 10.1038/s41379-020-0524-1. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32203095.
- [65] Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: Background and consensus recommendations from the college of American pathologists and the American society for colposcopy and cervical pathology. *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Jan;32(1):76-115. doi: 10.1097/PGP.0b013e31826916c7. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Jul;32(4):432. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Mar;32(2):241. PMID: 23202792.
- [66] Preti M, Igidbashian S, Costa S, Cristoforoni P, Mariani L, Origoni M, et al. VIN usual type - From the past to the future. *Ecancermedicallscience*. 2015 Apr 29;9:531. doi: 10.3332/ecancer.2015.531. PMID: 25987900; PMCID: PMC4431399.
- [67] Benedet J, Wilson P, Matisic J. Epidermal thickness and skin appendage involvement in vulvar intraepithelial neoplasia. *J Reprod Med* 1991;36:608–12.
- [68] Adamek K, Szczudrawa A, Basta A. Coexistence of VIN and vulvar invasive cancer with intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix and/or vagina, and HPV infection of

- the low female genital tract. *Ginekol Pol* 2003;74:657–61.
- [69] Jones RW, Rowan DM, Stewart AW. Vulvar Intraepithelial Neoplasia Aspects of the Natural History and Outcome in 405 Women. *Obstet Gynecol*. 2005 Dec;106(6):1319-26. doi: 10.1097/01.AOG.0000187301.76283.7f. PMID: 16319258.
 - [70] Van Seters M, Van Beurden M, De Craen AJM. Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence? A systematic review of 3322 published patients. *Gynecol Oncol* 2005;97:645–51. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.02.012>.
 - [71] Yang B, Hart WR. Vulvar Intraepithelial Neoplasia of the Simplex (Differentiated) Type A Clinicopathologic Study Including Analysis of HPV and p53 Expression. *Am J Surg Pathol*. 2000 Mar;24(3):429-41. doi: 10.1097/00000478-200003000-00013. PMID: 10716158.
 - [72] Reutter JC, Walters RA, Selim MA. Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia: What Criteria Do We Use in Practice? *J Low Genit Tract Dis*. 2016 Jul;20(3):261-6. doi: 10.1097/LGT.0000000000000211. PMID: 27105329.
 - [73] Preti M, Van Seters M, Sideri M, Van Beurden M. Squamous Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*. 2005 Dec;48(4):845-61. doi: 10.1097/01.grf.0000181738.37911.03. PMID: 16286831.
 - [74] Bigby SM, Eva LJ, Fong KL, Jones RW. The natural history of vulvar intraepithelial neoplasia, differentiated type: Evidence for progression and diagnostic challenges. *Int J Gynecol Pathol*. 2016 Nov;35(6):574-584. doi: 10.1097/PGP.0000000000000280. PMID: 26974999.
 - [75] Rosenthal A, Ryan A, Hopster D, Suretheran T, Jacobs I. High frequency of loss of heterozygosity in vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) is associated with invasive vulvar squamous cell carcinoma (VSCC). *Int J Cancer* 2001;94:896–900. <https://doi.org/10.1002/ijc.1549>.
 - [76] Ordi J, Alejo M, Ria V, Fuste´, F, Lloveras B, Del Pino M, et al. HPV-negative Vulvar Intraepithelial Neoplasia (VIN) With Basaloid Histologic Pattern An Unrecognized Variant of Simplex (Differentiated) VIN. *Am J Surg Pathol*. 2009 Nov;33(11):1659-65. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181b40081. PMID: 19730361.
 - [77] Rakislova N, Alemany L, Clavero O, Del Pino M, Saco A, Marimon L, et al. HPV-independent Precursors Mimicking High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL) of the Vulva. *Am J Surg Pathol*. 2009 Nov;33(11):1659-65. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181b40081. PMID: 19730361.
 - [78] Rakislova N, Alemany L, Clavero O, Del Pino M, Saco A, Quirós B, et al. Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia-like and Lichen Sclerosus-like Lesions in HPV-associated Squamous Cell Carcinomas of the Vulva. *Am J Surg Pathol*. 2018 Jun;42(6):828-835. doi: 10.1097/PAS.0000000000001047. PMID: 29505429.
 - [79] Rakislova N, Alemany L, Clavero O, del Pino M, Saco A, Marimon L, et al. HPV-independent Precursors Mimicking High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL) of the Vulva. *Am J Surg Pathol*. 2020;44:1506–14. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000001540>.

- [80] Carreras-Diequez N, Saco A, del Pino M, Pumarola C, del Campo RL, Manzotti C, et al. Vulvar squamous cell carcinoma arising on human papillomavirus-independent precursors mimicking high-grade squamous intra-epithelial lesion: a distinct and highly recurrent subtype of vulvar cancer. *Histopathology* 2023;82:731–44. <https://doi.org/10.1111/his.14860>.
- [81] Singh N, Gilks CB. Vulval squamous cell carcinoma and its precursors. *Histopathology* 2020;76:128–38. <https://doi.org/10.1111/his.13989>.
- [82] Van De Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, Van Der Zee AGJ, et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):297-305. doi: 10.1038/modpathol.2010.192. Epub 2010 Nov 5. PMID: 21057461.
- [83] Weyers W. Hypertrophic Lichen Sclerosus With Dyskeratosis and Parakeratosis-A Common Presentation of Vulvar Lichen Sclerosus Not Associated With a Significant Risk of Malignancy. *Am J Dermatopathol*. 2013 Oct;35(7):713-21. doi: 10.1097/DAD.0b013e31827e7ea9. PMID: 23328790.
- [84] Rakislova N, Saco A, Sierra A, Del Pino M, Ordi J. Role of Human Papillomavirus in Vulvar Cancer. *Adv Anat Pathol* 2017;24:201–14. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000155>.
- [85] Santos M, Montagut C, Mellado B, Garcia A, Ramon y Cajal S, Cardesa A, et al. Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *Int J Gynecol Pathol* 2004;23:206–14. doi.org/10.1097/01.pgp.0000130108.03231.89.
- [86] Vinokurova S, Wentzensen N, Eienkel J, Klaes R, Ziegert C, Melsheimer P, et al. Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1816–21. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji428>.
- [87] Clancy AA, Spaans JN, Weberpals JI. The forgotten woman's cancer: Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) and a targeted approach to therapy. *Ann Oncol*. 2016 Sep;27(9):1696-705. doi: 10.1093/annonc/mdw242. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27329249.
- [88] Trietsch MD, Nooij LS, Gaarenstroom KN, van Poelgeest MIE. Genetic and epigenetic changes in vulvar squamous cell carcinoma and its precursor lesions: a review of the current literature. *Gynecol Oncol* 2015;136:143–57. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.11.002>.
- [89] Nooij LS, Ter Haar NT, Ruano D, Rakislova N, van Wezel T, Smit VTHBM, et al. Genomic Characterization of Vulvar (Pre)cancers Identifies Distinct Molecular Subtypes with Prognostic Significance. *Clin Cancer Res* 2017;23:6781–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1302>.
- [90] Carreras-Diequez N, Saco A, del Pino M, Marimon L, López del Campo R, Manzotti C, et al. Human papillomavirus and p53 status define three types of vulvar squamous cell carcinomas with distinct clinical, pathological, and prognostic features. *Histopathology* 2023;83:17–30. <https://doi.org/10.1111/his.14925>.
- [91] Williams EA, Werth AJ, Sharaf R, Montesion M, Sokol ES, Pavlick DC, et al. Vulvar Squamous Cell Carcinoma: Comprehensive Genomic Profiling of HPV+ Versus HPV-Forms Reveals Distinct Sets of

- Potentially Actionable Molecular Targets. *JCO Precis Oncol*. 2020 Jun 16;4:PO.19.00406. doi: 10.1200/PO.19.00406. PMID: 32923875; PMCID: PMC7446361.
- [92] Zięba S, Pouwer AFW, Kowalik A, Zalewski K, Rusetska N, Bakula-Zalewska E, et al. Somatic mutation profiling in premalignant lesions of vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21144880>.
- [93] ACOG. Management of vulvar intraepithelial neoplasia. Committee Opinion N°509. *Obstet Gynecol* 2011;118:1192–4.
- [94] Ramírez M, Andía D, Bosch J, Cararach M, Coronado P, de Sanjosé S, et al. AEPCC-Guía: Neoplasia vulvar intraepitelial (VIN). del Pino M, Torné A, Eds.; 1st ed; Publicaciones AEPCC, 2015; ISBN 978-84-608-3825-8.
- [95] Kesić V, Vieira-Baptista P, Stockdale CK. Early Diagnostics of Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 4;14(7):1822. doi: 10.3390/cancers14071822. PMID: 35406594; PMCID: PMC8997501.
- [96] DeCuyper M, Kridelka F, Delbecq K, Goffin F. Pre-invasive Diseases of Vulva. In: Ayhan A, Fagotti A, Querleu D, Gultekin M, Akıllı H, Taskiran C, editors. *ESGO Textbook of Gynaecological Oncology*. Gold edition, Geneva: ESGO; 2021, p. 911–8.
- [97] Andía D, Cararach M, Castro M, García A, Juliá M, Mascaró JM. AEPCC-Guía: Dermatitis inflamatoria de la vulva (liquen escleroso, liquen plano y liquen simple crónico). Coordinador: Andía D. Revisores-editores: Torné A., del Pino M. Publicaciones AEPCC. 2016; pp: 1-52. ISBN: 978-84-617-6416-7.
- [98] Galaal K, Das N, de Barros Lopes A. Vulvar Cancers; Epidemiology and Treatment. In: Ayhan A, Fagotti A, Querleu D, Gultekin M, Akıllı H, Taskiran C, et al., editors. *ESGO Textbook of Gynaecological Oncology*. Gold Edition, Geneva: 2021, p. 925–30.
- [99] Alkatout I, Schubert M, Garbrecht N, Weigel MT, Jonat W, Mundhenke C, et al. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. *Int J Womens Health*. 2015;7:305–13. doi: 10.2147/IJWH.S68979. PMID: 25848321; PMCID: PMC4374790.
- [100] Olawaiye AB, Cotler J, Cuello MA, Bhatla N, Okamoto A, Wilailak S, et al. FIGO staging for carcinoma of the vulva: 2021 revision. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2021;155:43–7. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13880>.
- [101] Zach D, Stenström Bohlin K, Kannisto P, Moberg L, Kjölhede P. Time to extend the indication for sentinel node biopsy in vulvar cancer? Results from a prospective nationwide Swedish study. *Int J Gynecol Cancer*. 2023;33(12):1845-1852. doi: 10.1136/ijgc-2023-004790. PMID: 37918956; PMCID: PMC10803969.
- [102] Te Grootenhuis NC, Van Der Zee AGJ, Van Doorn HC, Van Der Velden J, Vergote I, Zanagnolo V, et al. Sentinel nodes in vulvar cancer: Long-term follow-up of the GROningen INternational Study on Sentinel nodes in Vulvar cancer (GROINSS-V) i. *Gynecol Oncol* 2016;140:8–14.

<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.09.077>.

- [103] Gadducci A, Tana R, Barsotti C, Guerrieri ME, Genazzani AR. Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;83:71–83. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.09.003>.
- [104] Woelber L, Mahner S, Voelker K, Eulenburg C, Giesecking F, Choschzick M, et al. Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. *Anticancer Res.* 2009 Feb;29(2):545-52. PMID: 19331201.
- [105] Maggino T, Landoni F, Sartori E, Zola P, Gadducci A, Alessi C, et al. Patterns of Recurrence in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Vulva A Multicenter CTF Study. *Cancer.* 2000 Jul 1;89(1):116-22. doi: 10.1002/1097-0142(20000701)89:1<116::aid-cnrc16>3.0.co;2-4. PMID: 10897008.
- [106] Coulter J, Gleeson N. Local and regional recurrence of vulval cancer: Management dilemmas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:663–81. [https://doi.org/10.1016/S1521-6934\(03\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S1521-6934(03)00050-6).
- [107] Zapardiel I, Iacoponi S, Coronado PJ, Zalewski K, Chen F, Fotopoulou C, et al. Prognostic factors in patients with vulvar cancer: The VULCAN study. *Int J Gynecol Cancer.* 2020 Sep;30(9):1285-1291. doi: 10.1136/ijgc-2019-000526. Epub 2020 Jun 22. Erratum in: *Int J Gynecol Cancer.* 2020 Dec;30(12):2023. doi: 10.1136/ijgc-2019-000526corr1. PMID: 32571891.
- [108] Ferrándiz-Pulido C, Masferrer E, De Torres I, Lloveras B, Hernandez-Losa J, Mojal S, et al. Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell carcinomas: Correlation with pathologic subtypes, p16INK4a expression, and prognosis. *J Am Acad Dermatol* 2013;68:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.05.029>.
- [109] Dwyer-Lindgren L, Cork MA, Sligar A, Steuben KM, Wilson KF, Provost NR, et al. Mapping HIV prevalence in sub-Saharan Africa between 2000 and 2017. *Nature* 2019;570:189. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1200-9>.
- [110] Kirrander P, Sherif A, Friedrich B, Lambe M, Hakansson U. Swedish National Penile Cancer Register: Incidence, tumour characteristics, management and survival. *BJU Int* 2016;117:287–92. <https://doi.org/10.1111/bju.12993>.
- [111] Bandini M, Ahmed M, Basile G, Watkin N, Master V, Zhu Y, et al. A global approach to improving penile cancer care. *Nat Rev Urol* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00557-y>.
- [112] Buonaguro FM, Tornesello ML, Salatiello I, Okong P, Buonaguro L, Beth-Giraldo E, et al. The Uganda study on HPV variants and genital cancers. *J Clin Virol.* 2000 Oct;19(1-2):31-41. doi: 10.1016/s1386-6532(00)00131-1. PMID: 11091146.
- [113] Maueia C, Murahwa A, Manjate A, Andersson S, Sacarlal J, Kenga D, et al. Identification of the Human Papillomavirus Genotypes, According to the Human Immunodeficiency Virus Status in a Cohort of Women from Maputo, Mozambique. *Viruses* 2021 Dec 23;14(1):24. doi:

- 10.3390/v14010024. PMID: 35062228; PMCID: PMC8780750.
- [114] González R, Munguambe K, Aponte J, Bavo C, Nhalungo D, Macete E, et al. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a community-based survey. *HIV Med* 2012;13:581–8. <https://doi.org/10.1111/J.1468-1293.2012.01018.X>.
 - [115] Lorenzoni C, Vilajeliu A, Carrilho C, Ismail MR, Castillo P, Augusto O, et al. Trends in cancer incidence in Maputo, Mozambique, 1991-2008. *PLoS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130469>.
 - [116] Frisch M, Biggar R, Goedert J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1500–10. <https://doi.org/10.1093/JNCI/92.18.1500>.
 - [117] Known and Probable Human Carcinogens. American Cancer Society, <https://www.cancer.org/cancer/risk-prevention/understanding-cancer-risk/known-and-probable-human-carcinogens.html>
 - [118] Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, Ibrahim Khalil A, Baussano I, Shah ASV, et al. Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob Health* 2021;9:e161–9. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30459-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30459-9).
 - [119] Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2016;70:93–105. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2016.02.029>.
 - [120] Moch H, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2022;82:458–68. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2022.06.016>.
 - [121] El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. SPJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 2017.
 - [122] Wang B, Gu W, Wan F, Wei Y, Xiao W, Lu X, et al. Prognosis of the 8th TNM Staging System for Penile Cancer and Refinement of Prognostication by Incorporating High Risk Human Papillomavirus Status. *J Urol*. 2020 Mar;203(3):562-569. doi: 10.1097/JU.0000000000000584. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31596650.
 - [123] Sand FL, Rasmussen CL, Frederiksen MH, Andersen KK, Kjaer SK. Prognostic significance of HPV and p16 status in men diagnosed with penile cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Urol*. 2020 Mar;203(3):562-569. doi: 10.1097/JU.0000000000000584. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31596650.
 - [124] Wilson M, Fleming K, Kuti M, Looi L, Lago N, Ru K. Access to pathology and laboratory medicine services: a crucial gap. *Lancet* 2018; 391:1927–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30458-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30458-6).

- [125] McDaniel AS, Hovelson DH, Cani AK, Liu CJ, Zhai Y, Zhang Y, et al. Genomic profiling of penile squamous cell carcinoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res* 2015;75:5219–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1004>.
- [126] Wang Y, Wang K, Chen Y, Zhou J, Liang Y, Yang X, et al. Mutational landscape of penile squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int J Cancer* 2019;145:1280–9. <https://doi.org/10.1002/ijc.32373>.
- [127] Trias I, Saco A, Marimon L, López del Campo R, Manzotti C, Ordi O, et al. P53 in Penile Squamous Cell Carcinoma: A Pattern-Based Immunohistochemical Framework with Molecular Correlation. *Cancers (Basel)* 2023; 15(10):2719. doi: 10.3390/cancers15102719. PMID: 37345055; PMCID: PMC10216449.
- [128] Morhason-Bello I, Baisley K, Pavon M, Adewole I, Bakare R, de Sanjosé S, et al. Prevalence and genotype specific concordance of oro-genital and anal human papillomavirus infections among sexually active Nigerian women. *Infect Agent Cancer*. 2021 Sep 8;16(1):59. doi: 10.1186/s13027-021-00398-9. PMID: 34496909; PMCID: PMC8424803.
- [129] Menéndez C, Castellsagué X, Renom M, Sacarlal J, Quintó L, Lloveras B, et al. Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women from a rural area of southern Mozambique. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010; 2010:609315. doi: 10.1155/2010/609315. Epub 2010 Jul 11. PMID: 20706691; PMCID: PMC2913799.
- [130] Parkin DM, Sitas F, Chirenje M, Stein L, Abratt R, Wabinga H. Part I: Cancer in Indigenous Africans-burden, distribution, and trends. *Lancet Oncol* 2008; 9:683–92. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70175-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70175-X).
- [131] Parkin DM, Chingonzoh T, Vuma S, Liu B, Chokunonga E, Ndlovu N, et al. Changes in the Incidence of Cancer in Bulawayo, Zimbabwe over a 50-Year Period. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2021; 30:867–73. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0669>.
- [132] Edna Omar V, Orvalho A, Nália I, Kaliff M, Lillsunde-Larsson G, Ramqvist T, et al. Human papillomavirus prevalence and genotype distribution among young women and men in Maputo city, Mozambique. *BMJ Open*. 2017 Jul 17;7(7):e015653. doi: 10.1136/bmjopen-2016-015653. PMID: 28716790; PMCID: PMC5722086.
- [133] Grulich A, Van Leeuwen M, Falster M, Vajdic C. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370:59–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61050-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2).