

RITA MAIRA ZANINE-KOSLINSKI



A INFEÇÃO DO COLO UTERINO FETAL PELO PAPILOMA VÍRUS
HUMANO: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA TRANSMISSÃO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da
Saúde da Univesidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para a obtenção do
Grau Acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii,

CURITIBA

1995

RITA MAIRA ZANINE-KOSLINSKI

A INFECÇÃO DO COLO UTERINO FETAL PELO PAPILOMA VÍRUS
HUMANO: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA TRANSMISSÃO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para a obtenção do
Grau Acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii,

CURITIBA

1995

Entrai pela porta estreita, porque larga é a porta e espaçoso o caminho que conduzem à perdição, e numerosos são os que por aí entram.

Mt. 7.13

Exemplos de fé, coragem, determinação
a meus pais Durval e Stella
dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr.Sérgio Ossamu Ioshii,

orientador deste trabalho, pelos ensinamentos e apoio nas etapas desta tese.

Ao Prof.Dr.Osvaldo Malafaia,

pelo incentivo aos meus estudos de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Affonso Antoniuk,

pelo estímulo e apoio.

Ao Prof.Dr.Reginaldo Werneck Lopes,

amigo e mestre, pelo contínuo estímulo a nossa formação.

A Dra.Simone Cristina Zanine,

irmã, amiga, grande incentivadora de nosso trabalho, pelo apoio nas etapas desta tese.

A Dra.Dulcemary Dias Bittencourt,

pela ajuda na revisão bibliográfica.

A Dra.Mônica Vertuan,

pela colaboração na revisão bibliográfica.

Ao Dr.Ricardo Rossi Cardoso,

pela colaboração na parte de informática.

Aos meus filhos Anna Paula, Anna Beatriz e Victor Hugo,

razão da minha vida

Ao meu marido Dionísio Koslinski,

pela compreensão, paciência e apoio.

A Srta.Ana Maria Nascimento,

fiel colaboradora, pelo estímulo constante sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| TABELA | VI |
| QUADROS | VII |
| SIGLAS | VIII |
| RESUMO | IX |
| ABSTRACTS | X |
| 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA | 1 |
| 1.1 O COLO UTERINO FETAL | 2 |
| 1.1.1 Anatomia | 2 |
| 1.1.2 Histologia | 3 |
| 1.1.3 Fisiologia | 4 |
| 1.2 O PAPILOMA VÍRUS HUMANO | 7 |
| 1.2.1 Formas de Infecção | 10 |
| 1.2.1.1 Infecção Clínica | 10 |
| 1.2.1.2 Infecção Sub-Clínica | 11 |
| 1.2.1.3 Infecção Latente | 12 |
| 1.2.2 Histopatologia da Infecção Clínica e Sub-Clínica | 13 |
| 1.2.3 Prevalência | 14 |
| 1.2.4 Transmissão | 15 |
| 1.2.5 Patogenia | 16 |
| 1.2.5.1 Incubação | 16 |
| 1.2.5.2 Fase Ativa | 17 |
| 1.2.5.3 Resposta do Hospedeiro | 17 |
| 1.2.6 Papiloma Vírus e a interação com o genoma do hospedeiro | 21 |
| 1.2.7 Suscetibilidade Genética | 23 |
| 1.2.8 Métodos para o diagnóstico do Papiloma Vírus Humano | 25 |
| 1.2.8.1 Colposcopia | 25 |
| 1.2.8.2 Microscopia Ótica | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.2.8.3 | Microscopia Eletrônica | 30 |
| 1.2.8.4 | Demonstração do Antígeno HPV pela Imunohistoquímica | 31 |
| 1.2.8.5 | Demonstração do HPV através dos métodos de B. Molecular | 35 |
| 1.2.8.6 | Indicações para o uso dos diferentes mét. de Hibridização | 40 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 2.1 | SELEÇÃO DOS CASOS | 42 |
| 2.2 | ESTUDO DOS COLOS UTERINO FETAIS | 43 |
| 2.2.1 | Histopatologia | 43 |
| 2.2.2 | Hibridização <i>in situ</i> | 43 |
| 2.2.3 | Reação em cadeia da polimerase | 44 |
| 2.3 | ESTUDOS REALIZADOS NAS MÃES | 46 |
| 2.3.1 | Estudo citopatológico | 46 |
| 2.3.2 | Estudo colposcópico | 46 |
| 2.3.3 | Estudo histopatológico | 47 |
| 2.3.4 | Reação em cadeia da polimerase | 47 |
| 3 | RESULTADOS | 49 |
| 4 | DISCUSSÃO | 64 |
| 5 | CONCLUSÕES | 71 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE FETAL NAS MULHERES COM TESTE DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR | 49 |
| TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA FAIXA ETÁRIA DAS MULHERES COM TESTE DA PCR | 50 |
| TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS NAS MULHERES COM TESTE DA PCR | 51 |
| TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO INÍCIO DA ATIVIDADE SEXUAL (FAIXA ETÁRIA) NAS MULHERES COM TESTE DA PCR | 52 |
| TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO TABAGISMO NAS MULHERES COM TESTE DA PCR | 53 |
| TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO À PARIDADE NAS MULHERES COM TESTE DA PCR | 54 |
| TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DAS LESÕES CLÍNICAS DO HPV NAS MULHERES COM EFEITO CITOPÁTICO VIRAL E TESTE PCR | 55 |
| TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DO RESULTADO DA PCR QUANTO AO TIPO DE BOLSA AMNIÓTICA | 56 |
| TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS DE COLPOCITOLOGIA EM RELAÇÃO AOS ACHADOS DE HISTOPATOLOGIA | 57 |
| TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS COLPOSCÓPICOS EM RELAÇÃO AOS ACHADOS DE HISTOPATOLOGIA | 58 |
| TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS DE COLPOCITOLOGIA EM RELAÇÃO AO TIPO DE VÍRUS ENCONTRADO NA PCR | 59 |
| TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS EM RELAÇÃO AOS TIPOS DE HPV | 60 |

QUADROS

QUADRO 1 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS FETOS, DAS MULHERES E DO INÍCIO DA ATIVIDADE SEXUAL EM RELAÇÃO À ESTATÍSTICA DESCRITIVA NA PCR 61

QUADRO 2 - RESULTADO DO TESTE APLICADO NA COMPARAÇÃO DAS MULHERES PCR POSITIVA EM RELAÇÃO ÀS MULHERES PCR NEGATIVA 62

QUADRO 3 - RESULTADO DO TESTE APLICADO NA COMPARAÇÃO DOS TIPOS DE EXAMES REALIZADOS 63

SIGLAS

CIN- neoplasia intra-epitelial cervical.

ECV- efeito citopático viral.

HPV- papiloma vírus humano.

PCR- reação em cadeia da polimerase.

ZTA- zona de transformação atípica.

ZTT- zona de transformação típica.

RESUMO

A infecção pelo papiloma vírus humano é responsável por uma grande variedade de lesões proliferativas em animais e também em seres humanos. A mesma possui uma íntima associação com as neoplasias do trato genital inferior.

Pouco se sabe sobre a sua transmissibilidade principalmente no que corresponde ao binômio mãe-feto. Por isso nos propusemos a estudar 28 colos uterinos de fetos e ou natimortos, analisando através de métodos de hibridização molecular, como a reação em cadeia da polimerase e a hibridização *in situ*, somadas a estudo histopatológico, a presença ou não de seqüências virais ou efeitos citopáticos da infecção pelo HPV.

Estes colos foram obtidos de material de arquivo num estudo retrospectivo onde 13 deles tinham suas mães portadoras do vírus em sua forma clínica ou latente, enquanto 15 mulheres não apresentaram o vírus. Todas as pacientes foram analisadas através da colpocitologia oncótica e também pela reação em cadeia da polimerase.

O nosso estudo sugere que a infecção do colo uterino pelo HPV não ocorre durante o período gestacional.

ABSTRACT

The papillomavirus infection is responsible for a wide variety of proliferative lesions in many animals including humans. This infection has a close association with the neoplasias of the inferior genital tract.

There is a lack of information about the mode of transmission principally between mother and fetus. Then our purpose was to study 28 cervix uteri of fetuses and still-born analysing through in situ hibridisation, polimerase chain reaction and histology the presence or not of the papillomavirus nucleic acid and viral cytophatic effect.

These cervix were obtained from archival material, where 13 mothers had clinical lesions or latent infections, while 15 women did not present any clinical lesion or latent one. All patients were analysed by polimerase chain reaction and Pap smears.

We conclude that is impossible the transmission during pregnancy of the HPV infection to the cervix uteri of the fetus.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A infecção do trato genital inferior pelo papiloma vírus humano (HPV) é considerada atualmente uma das doenças de transmissão sexual mais freqüente em todo o mundo. Todavia, apesar de ser conhecida desde a Antiguidade, somente na década de oitenta é que ela passou a ter uma maior atenção, particularmente por sua íntima relação com as neoplasias genitais malignas e seus precursores (zur HAUSEN, 1976).

Dependendo do método utilizado e do tipo de tecido examinado, cerca de 10% da população geral apresenta o DNA viral no interior do núcleo de células cervicais.

Existem algumas evidências apontando para uma maior incidência da infecção genital pelo papiloma vírus humano entre as mulheres grávidas (SCHNEIDER, 1987). Enquanto isso o comportamento da infecção viral é ainda incerto em meio à população de gestantes e o modo de transmissão desta no binômio mãe-feto é quase desconhecido. A maneira mais plausível de explicar este evento seria a inoculação durante a passagem do feto pelo canal de parto.

Por outro lado, relatos de papilomatose laríngea juvenil (KASHIMA, 1987), de condiloma acuminado congênito (TANG, 1978), de presença do DNA do HPV em prepúcio de recém-nato (ROMAN, 1986), na cavidade oral e também em líquido amniótico (SEDLACEK, 1989) de neonatos clinicamente normais nascidos de cesariana sugerem uma via de transmissão intra-uterina através da placenta já antes do nascimento.

1.1 O COLO UTERINO FETAL

Em termos gerais pouca atenção foi dada ao estudo do colo uterino fetal.

Sabemos que há um predomínio do colo em relação ao corpo do útero dando um aspecto de uma cérvix tremendamente hipertrofiada tanto em sentido longitudinal quanto transversal.

1.1.1 Anatomia

As medidas realizadas em úteros procedentes de diversas semanas de gestação comprovam que as diferenças de tamanho entre corpo e colo vão diminuindo paulatinamente à medida que a gestação aumenta, conquanto o comprimento total tenha uma aceleração de seu crescimento a partir da 32a. semana de gestação.

As observações feitas por BONILLA em 1959 confirmam o índice de MEAKER (1934), que nos permite obter detalhes mais precisos acerca da relação entre as dimensões do corpo e do colo uterinos ao longo do período gestacional. Até 24 semanas o índice é de 0,13. Este aumenta gradativamente até um valor médio de 0,38 ao término da gravidez, o que indica que, nesta época, colo e corpo tendem a igualar-se, sendo que existem úteros cujas cérvixes continuam maiores em comprimento que o respectivo corpo. A involução da cérvix uterina vai realizar-se em sua maioria na vida extra-uterina.

O orifício cervical externo apresenta-se em fenda transversa com um relevo irregular do pórtio uterino que vem a contrastar com a superfície lisa da cérvix da nulípara. Este achado se deve ao canal cervical que ainda não está totalmente formado.

A forma do canal cervical é bastante variável, ele pode apresentar-se sob a forma cilíndrica, cônica, fusiforme, ovóide e copa invertida.

Predomina com evidência a forma cilíndrica, vindo depois a cônica, a fusiforme e as outras mencionadas anteriormente. Estas diversas formas têm relação com a idade gestacional e são consequência dos estreitamentos que darão lugar aos orifícios cervicais interno e externo. Quando não ocorre a estenose, o canal cervical toma uma forma cilíndrica. O estreitamento ao nível do orifício cervical interno proporciona um formato cônico e, quando começa a estenosar-se, a parte inferior adquire a forma fusiforme.

Apesar de ser difícil de se identificar, o istmo uterino pode ser reconhecido a partir de 20 semanas (SONG, 1964).

Muitas vezes a cavidade cervical não se apresenta totalmente desenvolvida ao final do período gestacional; em alguns casos persiste a forma cilíndrica. Isto traz uma consequência clínica chamada incompetência cervical congênita (BONILLA, 1961), a qual existe em 33% dos úteros fetais dos quais alguns evoluíram até formar-se o orifício cervical interno (BONILLA, 1963), enquanto em outros casos a anomalia persistirá e dará lugar à síndrome da incompetência istmo-cervical.

1.1.2 Histologia

Ao redor da 24^a semana, o epitélio pavimentoso está perfeitamente diferenciado, podendo-se contar 15 a 20 camadas celulares. As camadas superficiais são aplanadas e as camadas intermediárias têm um aspecto claro muito nítido. A camada basal é formada por 2 a 4 camadas de células cúbicas, pequenas com um núcleo grande e pouca quantidade de citoplasma.

Nos úteros das recém-nascidas de termo, o epitélio tem uma espessura maior com 30 a 40 camadas de células que em sua maioria correspondem à camada intermediária. A reação de PAS, sem a ação da diastase, é fortemente

positiva. A camada basal continua exibindo as características citadas anteriormente, embora seus núcleos mostrem uma certa verticalidade.

As células parabasais podem ser reconhecidas por sua forma octogonal e seu citoplasma relativamente denso, mas fica muito claro que não existe proliferação das células basais.

O epitélio cilíndrico que recobre o canal cervical é formado por uma camada de células cúbicas. Elas vão se tornando mais cilíndricas a partir da 20ª semana (WITSCHI, 1970), a secreção é intensa como também o é a sua coloração pelo PAS. Características idênticas tem o epitélio glandular com as glândulas repletas de secreção em seu interior.

Na cérvix do útero fetal não se detecta a reação decidual da mesma.

1.1.3 Fisiologia

O colo uterino fetal secreta enorme quantidade de muco, pois é rico em glândulas. A secreção é tão grande que chega a fazer uma repleção completa das cavidades tanto endocervical quanto corporal e ainda mesmo a vaginal. A consistência do muco é muito firme e a sua aderência é considerável. A cristalização do muco é sempre negativa (AMUNDARAIN, 1962). O seu comportamento é idêntico ao muco do colo gravídico.

A comparação inevitável do colo fetal com o colo gravídico vem do fato de o primeiro ter um tamanho considerável, conseqüência de um processo hiperplásico que se manifesta histologicamente através da proliferação do epitélio pavimentoso e também do glandular com uma conseqüente secreção intensa de muco por parte deste último.

Ambos estão submetidos à influência dos esteróides sexuais. Estudos indicam que a concentração de estrogênios no sangue fetal é 70% maior que a

encontrada no plasma materno (SKLOW, 1942). O feto está inundado por hormônios durante seu desenvolvimento intra-uterino. De todos os esteróides, o mais pronunciado é o estriol, por ser o metabólito que predomina durante a gestação. Como é de se esperar, a hormonologia muda radicalmente após o nascimento, pois o feto não consegue secretar os hormônios no mesmo ritmo, sendo que lhe faltam os precursores que eram fornecidos anteriormente através da mãe. Tal privação tem uma repercussão de forma ostensiva no aparelho genital.

Clinicamente se tem observado que os genitais externos da recém-nascida são edemaciados e congestionados. Durante a primeira semana de vida extra-uterina, observa-se a aparição de um fluxo claro e viscoso que inicialmente se torna amarelo e mais espesso posteriormente. Pouco a pouco o edema, a congestão e a descarga leucorréica vão desaparecendo. Às vezes o fluxo tem características sanguinolentas. A hemorragia aparece entre o terceiro e o sexto dia do período pós-natal e tem uma freqüência estimada em 3% dos casos. Estes dados caracterizam o que chamamos de crise genital da recém-nascida.

A explicação deste quadro é fácil se recordarmos a ação morfogenética do estriol, que sobre os genitais externos provoca um edema (BACHMAN, 1935) e tem uma ação mais efetiva na abertura do intróito vaginal do que a estrona ou o estradiol. Seu efeito sobre a cornificação vaginal é dez vezes mais intenso do que o causado por outros estrogênios. Diferenças mais acentuadas existem no tocante ao efeito morfogenético sobre o útero. Enquanto o estradiol provoca uma proliferação intensa do endométrio e do miométrio, o estriol desencadeia uma hipertrofia do canal cervical acompanhada de dilatação e acentuação do pregueamento da sua mucosa (PUCK, 1956), estimulando intensamente a secreção de muco. Como não tem ação sobre o endométrio, não causa hemorragia de privação hormonal (SCHILLER, 1945).

No útero fetal a mucosa do corpo é muito simples, formada por uma camada única de células cilíndricas baixas ou cubóides com pequenas

invaginações que indicam o lugar das futuras glândulas (FLUHMANN, 1961). Enquanto as células do colo são PAS-positiva, as células do corpo são PAS-negativa. Isto significa que estas últimas não respondem aos estímulos hormonais.

Todas as investigações feitas em cérvices fetais vêm a comprovar que existe uma extensa descamação celular durante os primeiros dias de vida, a qual vai cedendo paulatinamente através do desaparecimento das células superficiais e aparecimento simultâneo de células dos estratos profundos. Ao término de três semanas se observa uma atrofia intensa.

Quanto à interpretação dos achados citológicos, elas são díspares. Alguns autores os consideram estrogênicos (ALEXIU, 1938 e MONTALVO, 1952) enquanto FRAENKEL e PAPANICOLAOU em 1938 os compararam com o esfregaço pré-ovulatório da mulher adulta. O escasso número de núcleos picnóticos fez AYRE em 1951 suspeitar ser o estímulo estrogênico insuficiente. Para SMOLKA em 1954, o quadro citológico se assemelha a uma gravidez, enquanto BECK em 1956 acredita que eles traduzem tanto ação estrogênica quanto androgênica.

Podemos resumir estas observações dizendo que, nos primeiros dias de vida da recém-nascida, pode-se comprovar descamação intensa de um epitélio proliferativo, que é prontamente substituída por um quadro citológico de atrofia.

Certamente tanto o colo uterino fetal como a cérvix da mulher grávida estão submetidos a estímulos hormonais semelhantes, mas a conduta de ambos como órgãos efetores não é a mesma, posto que no colo fetal não se observa hiperplasia da camada basal do epitélio pavimentoso, nem vascularização tão intensa que transforme o colo em um órgão cavernoso. Evidentemente existe hipertrofia considerável dos elementos glandulares e secreção abundante de muco que se comporta físico-quimicamente como o muco cervical da grávida.

Mas, desaparecida a influência hormonal gravídica, apenas se descamam as células cervicais, de maneira que o colo fetal não contribui praticamente na crise genital da recém-nascida.

1.2 O PAPILOMA VÍRUS HUMANO

O papiloma vírus humano pertence à família *papovaviridae*, que é uma família de vírus de DNA constituída por dois gêneros:

a) gênero A- papiloma;

b) gênero B- polioma e

SV-40 (Simian Vacuolating Vírus).

Uma das principais diferenças entre os dois gêneros é que o papiloma vírus não pode ser cultivado e é específico de certos hospedeiros e de certos hóspedes, não causando assim infecção em outras espécies. O vírus do polioma pode ser cultivado e não afeta o homem.

No gênero papiloma estão compreendidos outros vírus, como o papiloma vírus bovino e o papiloma vírus de Shope.

O papiloma vírus humano é pequeno com cerca de 50µm de diâmetro. Seu genoma é constituído por 8.000 pares de bases com peso molecular de $5,2 \times 10^6$ daltons. O capsídio viral é composto por 72 capsômeros organizados em uma estrutura icosaédrica (PFISTER, 1987).

As partículas virais se diferenciam entre si pela seqüência dos nucleotídeos do DNA.

Até o momento foram identificados 60 tipos de HPV pela hibridização molecular. Um HPV é considerado um novo tipo quando seu DNA tem menos que 50% de homologia com o genoma de um outro tipo já definido (DE VILLERS, 1988 e Howley, 1986).

A organização genômica de todos os papilomas vírus parece ser similar.

O genoma pode ser dividido em 2 regiões codificadoras separadas por um segmento não codificado:

- a região codificadora E (*early*: precoce), que representa cerca de 45% do genoma viral, contém os genes E1-E8, que são necessários para a replicação viral e para a transformação celular. Os genes E6-E7 estão implicados como genes de transformação oncogênica do HPV 16-18;
- a região codificadora L (*late*: tardia), que representa ao redor de 40% do genoma viral, contém os genes L1 e L2, que codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral.

A região não codificadora está localizada entre o término da região L e o começo da região E. Denominada comumente por LCR (long control region), representa cerca de 15% do genoma viral, e intervém no controle da expressão dos genes virais (SOUSA, 1990).

Cada tipo de HPV está associado a uma entidade clínico-patológica diferente, se bem que outros tipos possam também associar-se com a mesma entidade.

A especificidade tissular dos HPV é aparentemente exclusiva para o epitélio pavimentoso e para as mucosas.

Do ponto de vista de suas propriedades biológicas, os vírus se dividem em 3 grupos:

- a) vírus cutâneotrópicos em indivíduos imunologicamente normais;
- b) vírus cutâneotrópicos em indivíduos imunodeficientes;
- c) vírus mucosotrópicos que infectam as mucosas genitais, bucal e respiratória.

Dos 60 tipos já identificados, 23 atuam na esfera genital.

O primeiro vírus implicado na oncogênese e estudado junto a cofatores químicos aceleradores da transformação maligna foi o papiloma de Shope na década de 30 (SHOPE, 1933 e RAUS, 1944).

Os papilomas vírus mantiveram-se alienados dos estudos da oncogênese viral durante 40 anos devido à impossibilidade de serem cultivados *in vitro* e de só se replicarem em células diferenciadas. Na metade da década de 70, com o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, muitos progressos aconteceram e foi então descoberto a heterogenicidade dos papilomas vírus. Só recentemente, porém, foi dada a devida importância ao papel do vírus na carcinogênese. Hoje em dia, há uma abundante literatura implicando o HPV na gênese do carcinoma do trato genital inferior, dos carcinomas cutâneos associados com epidermodisplasia verruciforme e também de outros tumores.

A infecção genital pelo HPV é uma doença de transmissão principalmente sexual. Sua maior incidência é na faixa etária correspondente aos 20-30 anos, mais freqüentemente entre os indivíduos promíscuos.

A relação causal entre condiloma e HPV, sugerida por partículas virais (DELLA TORRE, 1978) e por evidências mediante métodos imunohistoquímicos (DELLA TORRE, 1983, FERENCZY, 1981, MORIN, 1981, WOODRUFF, 1980), foi confirmada recentemente pelos estudos de KREIDER et alii em 1985, que satisfizeram o 3º postulado de KOCH, segundo o qual um agente etiológico isolado e cultivado reproduz a doença uma vez inoculado em um animal de laboratório.

Estes autores reproduziram um condiloma inoculando debaixo da cápsula renal de um rato atímico um fragmento de mucosa da zona de transformação de um útero obtido durante uma histerectomia, previamente infectado com HPV 11. Uma vez sacrificado o animal, o exame do rim extraído e fixado em formol demonstrou a presença, no lugar da inoculação, de uma lesão com as

características morfológicas do condiloma e que mostrou-se positiva na investigação imunohistoquímica e nos estudos moleculares, com positividade na reação com sonda para o HPV 11.

1.2.1 Formas de Infecção

A infecção do trato genital inferior pelo HPV se divide em clínica, sub-clínica e latente.

1.2.1.1 Infecção Clínica

A forma clínica é aquela que se evidencia clinicamente, ou seja, mediante a observação à vista desarmada.

O diagnóstico das formas clínicas de infecção pelo HPV não apresenta dificuldades. Os condilomas acuminados dos genitais externos são bem conhecidos dos ginecologistas, urologistas e dermatologistas e tiveram suas primeiras descrições feitas pelos gregos antigos.

Durante muitos anos, pensava-se que as verrugas cutâneas e os condilomas genitais eram uma só afecção com diferentes expressões clínicas, devidas a sua diferente localização anatômica. A etiologia viral das verrugas cutâneas foi posta em evidência por CIUFFO em 1907 e estabelecida de modo definitivo no final da década de 40 com a demonstração de partículas virais mediante a microscopia eletrônica.

A etiologia viral dos condilomas foi demonstrada depois por DUNN e OLGIVIE em 1968 e ORIEL e ALMEIDA em 1970, utilizando-se do mesmo método.

O aspecto macroscópico dos condilomas exofíticos (acuminados) é o de pequenas formações sésseis, papilares, múltiplas, em formas de pequenos cistos cobertos por epitélio ceratótico. Estes condilomas localizam-se em regiões úmidas, especialmente aquelas expostas à fricção durante o ato sexual. Desta

maneira, os lugares mais freqüentes na mulher são a parte posterior do intróito vaginal, os lábios menores e o vestibulo, a zona anal e perianal. As lesões aumentam de tamanho com o passar do tempo. Com freqüência, são confluentes com um crescimento em forma de “couve-flor” (lesões papilomatosas) e podem ocupar também grande área da vulva e períneo. A grande maioria das lesões exofíticas está relacionada com o HPV 6 e 11. Segundo COUPEZ em 1974, a infecção clínica é rara no colo do útero.

A infecção clínica pode apresentar-se de 3 formas:

- a) papiloma ceratinizado;
- b) aspecto ceratosiforme;
- c) papilomatose.

1.2.1.2 Infecção Sub-Clínica

Somente em anos mais recentes é que os chamados condilomas planos ou formas sub-clínicas da infecção pelo HPV foram identificados.

Na década de 70 (MEISELS e FORTIN, 1976 e PUROLA e SAVIA, 1977), foi demonstrado que algumas lesões citológicas, até então classificadas como neoplasia intra-epitelial cervical grau I (CIN I), eram atribuídas a um efeito citopático viral.

A infecção sub-clínica é a forma mais freqüente de infecção pelo HPV no colo uterino. O diagnóstico é muito difícil e só é possível mediante o emprego da colposcopia após a aplicação de ácido acético a 2%.

1.2.1.3 Infecção Latente

Uma célula infectada pelo HPV pode não mostrar sinais de infecção do ponto de vista de alterações na sua morfologia. Mesmo assim, esta mesma célula se replicará e amadurecerá como se o genoma viral estivesse inativo ou latente. Conquanto o genoma viral persista, isto resultará numa infecção sem alteração do fenótipo escamoso normal, determinando assim o que chamamos de infecção latente. Evidência disto vem da habilidade em detectar-se seqüências do DNA do HPV obtidos de raspados da zona de transformação cervical apesar de não haver alterações citológicas evidentes (LORINCZ, 1986).

O genoma viral pode persistir em cultura de células *in vitro* sem alterações na morfologia celular ou nas características de crescimento da mesma (LANCASTER, 1975 e LA PORTE, 1982).

Epitélios histologicamente normais, adjacentes a condilomas, ou neoplasias intra-epiteliais freqüentemente contêm seqüências de DNA viral (FERENCZY, 1985). O mecanismo que controla esta latência não é conhecido, mas, durante a gestação, uma lesão causada pelo HPV freqüentemente se desenvolverá na cérvix para involuir somente após a gravidez (KISTNER, 1955).

É possível que, durante a infecção latente, o sistema imune, ou algum fator controlado pelo sistema imune, seja capaz de manter a expressão gênica do HPV num estado no qual a morfologia celular não se modifique. Uma vez que o sistema imune seja perturbado, como durante a gestação, o hospedeiro perde o controle sobre a expressão gênica viral, a qual resulta na ativação do genoma viral e na indução das alterações celulares. Esta hipótese sugere a existência de um fator humoral produzido pelo sistema imune, o qual pode reprimir a expressão gênica viral.

A vigilância imunológica é um mecanismo atrativo para explicar a latência, entretanto alguns mecanismos alternativos também poderiam ter o seu papel.

Fatores afetando a replicação celular e a diferenciação podem controlar a expressão gênica do HPV. A síntese dos polipeptídeos estruturais do vírus na neoplasia intra-epitelial cervical grau I (CIN I) e neoplasia intra-epitelial cervical grau II (CIN II) parece ser modulada, quando a neoplasia intra-epitelial cervical grau III (CIN III) está também presente (KURMAN, 1983).

Normalmente os antígenos virais não são detectados nas lesões correspondentes a CIN III por causa da perda da permissividade das células diferenciadas para a produção viral. Por outro lado, cerca de 43% das lesões correspondentes a CIN I contêm antígenos virais, entretanto, quando uma área de CIN I está presente na mesma biópsia de CIN III, a frequência de detecção de antígenos na área de CIN I é reduzida. Este efeito de campo pode ser devido a fatores liberados pelas células neoplásicas, que interrompem a expressão gênica tardia em células infectadas permissivas. Outro mecanismo pode ser a supressão da expressão gênica viral ao nível do controle transcripcional.

1.2.2 Histopatologia da Infecção Clínica e Sub-Clínica

Do ponto de vista histopatológico tanto a infecção clínica como a sub-clínica caracterizam-se por alterações epiteliais que superpõem-se por completo. Estas alterações podem resumir-se em:

- a) hiperplasia da camada basal;
- b) acantose;
- c) alterações citopáticas características, como presença de halo coilocitótico, picnose, distribuição irregular da cromatina, núcleos duplos ou múltiplos, alteração da relação núcleo-citoplasmática com

formação de pequenas células com citoplasma maduro ceratinizado e núcleos picnóticos definidos como disceratinócitos.

A infecção do trato genital baixo pelo HPV pode estar associada à CIN. Neste caso podem ser encontradas 3 situações do ponto de vista histopatológico:

- a) presença de uma CIN com evidência de infecção por HPV superposta;
- b) presença simultânea, em áreas separadas mas adjacentes, de CIN e de infecção pelo HPV;
- c) presença simultânea, em áreas contíguas, de CIN com infecção pelo HPV superposta e de infecção pelo HPV.

Estas diferentes manifestações e associações histopatológicas possíveis explicam as dificuldades que se fazem presentes no diagnóstico colposcópico.

1.2.3 Prevalência

A infecção pelo HPV é uma das mais comuns atualmente. O aumento da prevalência desta infecção em sua forma clínica nas duas últimas décadas é impressionante (ORIEL, 1986).

O aumento da frequência da infecção sub-clínica é inequívoco, se bem que este pode ser em parte devido a uma reinterpretação dos aspectos citopatológicos, colposcópicos e histopatológicos, antes classificados como CIN I. Sem dúvida em alguns países o aumento da promiscuidade sexual, o início precoce da atividade sexual e a abolição do uso do preservativo em favor da anticoncepção hormonal aumentaram a frequência da infecção sub-clínica pelo vírus.

A prevalência dos efeitos citopáticos do HPV nos exames citológicos dos esfregaços cérvico-vaginais está compreendida entre 0,5 a 4,1% na população geral e, em pacientes de clínica privada, pode chegar a 16% (zur HAUZEN, 1985).

1.2.4 Transmissão

O método de transmissão aceito pela maioria dos autores é o contato sexual. Na Antigüidade as verrugas genitais não eram consideradas uma doença venérea verdadeira, pois pensava-se que esta fosse transmitida somente através do contato homossexual masculino (BAFVERSTEDT, 1967).

Em 1954, BARRET e colaboradores foram os primeiros a demonstrar clinicamente a possibilidade da transmissão sexual desta doença. Eles estudaram 24 mulheres casadas com soldados americanos que haviam participado da Guerra da Coréia, sendo que as mesmas eram portadoras de verrugas genitais. Examinando seus maridos, foi verificado que os mesmos eram portadores da forma exofítica do condiloma ou referiam a presença desta, anteriormente, no período em que se encontravam servindo no Oriente. Verificou-se também que os mesmos relataram contato sexual prévio na Coréia com mulheres que apresentavam verrugas na genitália. Estes mesmos autores demonstraram uma baixa incidência da doença entre militares que não haviam servido no Oriente. Sugeriram então o contato sexual como o meio de transmissão desta doença .

Em 1967, DANOS sugeriu que uma grande quantidade de vírus poderia propagar-se em meio a população de uma maneira não detectável. Os mecanismos de transmissão poderiam ser horizontais ou verticais, com o vírus sendo transmitido intra-útero e em seguida contido por mecanismo imunitário competente.

Em 1971, ORIEL encontrou lesões tipo verruga vulgar em mãos e genitais de um pequeno grupo de pessoas e sugeriu a auto-inoculação como um meio de transmissão

A transmissão hematogênica foi proposta por TANG em 1978, quando da observação de lesões condilomatosas exofíticas na região perianal de um feto prematuro do sexo masculino por ocasião de seu nascimento.

Em 1986, McCANCE e colaboradores levantaram a hipótese de transmissão iatrogênica da doença através de material de uso médico, tais como espéculos. Observaram que, em meio a mostras de 24 espéculos examinados, 4 apresentavam-se positivas para o HPV 16 através de métodos de biologia molecular. Células contaminadas com o referido vírus podem ser encontradas em meio a luvas e material de endoscopia (GROSS, 1989).

Um modo de transmissão não coital seria a auto-inoculação ou a inoculação acidental através dos pais em crianças de tenra idade (BARUAH, 1984).

Entre nós, ARMBRUSTER-MORAES e colaboradores (1994) detectaram, através da reação em cadeia da polimerase, a presença de DNA viral em 24 de 37 amostras de líquido amniótico.

1.2.5 Patogenia

O papiloma vírus humano penetra nas células da camada basal do epitélio que freqüentemente estão expostas a microtraumatismos. Os vírions perdem seu invólucro protéico e o genoma viral penetra no núcleo da célula onde permanece em forma episomal.

1.2.5.1 Incubação

O vírus replica-se nos núcleos das células basais, donde outras áreas do epitélio podem ser infectadas. O período para o aparecimento dos sintomas ou alterações morfológicas epiteliais varia de 2 a 8 meses (LANCASTER, 1981).

1.2.5.2 Fase Ativa

A colonização pode manter-se na fase latente ou dar lugar a uma fase ativa de expressão viral. Isto pode ocorrer devido à presença de fatores predisponentes relacionados com o hospedeiro, com o tipo de HPV e com a presença de cofatores. Esta fase manifesta-se através de proliferação epitelial e de crescimento estromal com intensa vascularização, que mostra um amplo espectro de expressão, que vai desde a infecção sub-clínica até a infecção clínica, as quais se diferenciam somente pelas características macroscópicas, porque uma vem a ser a continuação da outra.

1.2.5.3 Resposta do Hospedeiro

Quando o hospedeiro não pode controlar a expressão gênica viral, a infecção produtiva começa, resultando numa produção de polipeptídeos virais. Estes, por sua vez, induzem à maturação anormal de lesões não displásicas e, nos casos de neoplasia intra-epitelial, dão lugar a alterações proliferativas anormais.

Alguns polipeptídeos virais foram identificados na membrana citoplasmática das células transformadas pelo HPV e em linhagens celulares de carcinomas cervicais (SMOTKIN, 1986 e ANDROPHY, 1985).

Poderíamos antecipar que o sistema imune do hospedeiro reagiria vigorosamente contra estes antígenos, apesar das lesões neoplásicas intra-epiteliais persistirem durante meses antes de regredirem. O que quer que estimule o sistema imune para responder, o fenômeno de regressão parece ser mediado por imunidade celular.

Remissão espontânea das verrugas planas da pele são caracterizadas por infiltrado celular composto principalmente por linfócitos T e fagócitos (BERMAN, 1977 e IWATSUGI, 1986).

A presença de linfócitos e fagócitos posicionados imediatamente adjacentes aos ceratinócitos danificados é sugestiva de destruição mediada por célula.

Estudos *in vitro* com verrugas planas têm demonstrado que os ceratinócitos proliferativos de verrugas são destruídos pela migração dos linfócitos T provenientes destes estratos (TAGOMI, 1985).

Indivíduos com infecção latente entretanto ter uma resposta anormal à infecção viral. Eliminando as células infectadas, o sistema imune pode modular a expressão gênico-viral. Em consequência, nenhum gene viral é expressado na superfície celular.

Estudos feitos, examinando a expressão gênica viral nos papilomas laríngicos, mostraram que genes de papiloma vírus são modulados de alguma maneira. Os antígenos estruturais do HPV foram detectados em cerca de 48% das pacientes nas quais uma única biópsia foi realizada. Por outro lado, quando pelo menos 4 biópsias foram feitas na mesma paciente, pelo menos uma continha antígenos virais (LOCK, 1980). Isto parece então ser um ciclo periódico de expressão gênico-viral, o qual pode ser controlada por fatores do hospedeiro.

Recentemente um estudo com homens homossexuais portadores de carcinoma anorretal revelou síntese de proteína do capsídeo viral em 5 de 8 lesões (GOL, 1987).

O sistema imunológico tem um papel significativo na remissão das lesões produzidas pelo HPV. Estudos antigos com o papiloma de SHOPE demonstraram que a rejeição é diretamente contra antígenos celulares, desde que papilomas possam ser induzidos através da injeção de DNA viral (EVANS,

1966). Por outro lado, anticorpos de proteção estão diretamente contra os componentes estruturais do vírus (EVANS, 1963).

Indivíduos, cujas verrugas de pele regrediram, são presumivelmente resistentes à reinfeção devido aos anticorpos circulantes. Parece lógico que o mesmo tipo de proteção ocorra depois da regressão de uma lesão cervical induzida pelo HPV. Isto não foi demonstrado, entretanto, porque não há um teste disponível para detectar anticorpos no soro para antígenos estruturais de HPV anogenitais. Parece que a resposta imune para estes antígenos são fracas desde que as lesões de mucosa contêm menor quantidades de antígenos do que os papilomas cutâneos.

A persistência, tanto das verrugas vulgares como das plantares, tem sido muito bem documentada e provavelmente reflete uma resposta imune incompleta. Uma razão para a persistência de CIN poderia ser alguma dificuldade na parte do sistema imune em reconhecer os antígenos HPV específicos que são necessários para uma resposta imune. A exposição contínua destas lesões persistentes a outros fatores, como por exemplo os carcinógenos encontrados nos produtos do tabaco, ou talvez infecção pelo herpes vírus genital, ou outra infecção concomitante com um outro tipo de HPV, poderia estimular a proliferação das células basais dentro de uma lesão benigna. Estas mudanças celulares poderiam surgir de alterações dos genes celulares, como a ativação de oncogenes ou mutação, ou transativação do genoma do HPV, resultando numa progressão para a neoplasia.

Se o sistema imune responde aos antígenos do papiloma vírus como outros antígenos celulares associados, então os linfócitos T citotóxicos e auxiliares reconheceriam os antígenos de HPV somente em associação com as glicoproteínas da superfície celular codificadas pelo complexo de histocompatibilidade (ZINKERNAGEL, 1979).

Portanto, uma série complexa de interações entre uma variedade de células pode ser necessária para uma resposta imunológica efetiva para a

infecção pelo HPV. Falta de resposta pode ser atribuída a defeitos que ocorrem no processamento dos antígenos de HPV ou na apresentação dos antígenos ao sistema imune.

O sucesso de algumas vacinas autógenas para o tratamento do condiloma (POWELL, 1970) poderia refletir um desvio no processamento normal do antígeno, com uma exposição mais eficiente do antígeno viral para o sistema imune. Alternativamente mediadores solúveis poderiam modular a resposta do sistema imune para antígenos selecionados.

Outra possibilidade é a perda de genes apropriados codificadores de moléculas de proteínas necessárias para o reconhecimento dos antígenos. Se um defeito imunológico pudesse ser definido, seria possível o "*screening*" de populações para a infecção pelo HPV, para identificar os indivíduos de risco por causa de uma inabilidade para armar uma resposta imune para estes vírus.

O desenvolvimento de uma lesão induzida pelo papiloma vírus é relativamente lento, desde que a produção viral seja dependente da diferenciação de uma célula basal infectada a um ceratinócito maduro. Na ordem da infecção completar o seu curso, o papiloma vírus deve ter desenvolvido um mecanismo próprio que faça com que as células infectadas não sejam reconhecidas pelo sistema imune.

Se os HPV tiverem que modular a quantidade de antígenos classe I disponíveis na superfície celular, isto poderá ser responsável pela perda da resposta imune das lesões de alguns indivíduos.

1.2.6 Papiloma Vírus Humano e a interação com o genoma do hospedeiro

Se o hospedeiro é incapaz de dar uma resposta contrária às células infectadas, a lesão persistirá. Dentro da lesão, as células das camadas parabasais não amadurecem apropriadamente e, permanecendo neste estágio de imaturidade celular, elas poderão ficar mais susceptíveis aos eventos proliferativos induzidos através de fatores secundários. Desde que estas células não alcancem as outras camadas do epitélio oportunamente, elas terão uma média de vida maior que as suas companheiras normais e terão um potencial de crescimento maior e também algumas propriedades das células imortalizadas. É possível que o genoma do HPV codifique uma função que poderá atuar como o adenovírus E1a ou o *c-myc*.

Nenhum gene sozinho pode transformar células primárias, mas poderá imortalizar as células sem mudar a sua morfologia (HOUWELING, 1980 e LEE, 1985). Alguns papilomas vírus possuem uma ação similar.

A transformação celular *in vivo* ou em cultura pelo papiloma vírus bovino e do cervo é caracterizada pela manutenção do fenótipo transformado por causa da perda de integração das seqüências virais com o genoma da célula hospedeiro (LANCASTER, 1981 e GRAFF, 1983). Este fenômeno também foi observado nos papilomas induzidos em coelhos (WETTS, 1982). Seqüências virais nos carcinomas que foram induzidos a partir de papilomas benignos são porém freqüentemente integrados (MCVAY, 1982).

Igualmente, lesões induzidas pelo HPV, como condiloma e neoplasia intra-epitelial, também contêm seqüências de DNA episomais, enquanto nos cânceres as seqüências virais são integradas (GISSMANN, 1986 e DURST, 1985).

Uma questão perturbadora se coloca: a integração das seqüências do HPV resulta em transformação maligna ou ela é resultado desta?

É desconhecido o quanto seria comum a integração das seqüências do HPV nas lesões pré-malignas iniciais, embora seja possível que o genoma viral se integre mais freqüentemente do que se pensava anteriormente.

A integração poderia agir como um mutante talvez ativando um proto-oncogene. Sítios de integração dos genomas HPV-16 e HPV-18 foram localizados nos cromossomos das linhagens celulares de carcinomas cervicais (DURST, 1987 e COPESCU, 1987).

As seqüências virais estão integradas a um determinado número de lugares e parecem não ser específicas para um dado cromossomo.

Apesar da integração não ser adjacente a oncogenes conhecidos, é possível que oncogenes não identificados possam ser ativados pela integração do DNA viral. A amplificação dos oncogenes *c-myc*, *Ha-ras*, ou de ambos, foi encontrada numa proporção significativa de cânceres cervicais em estado avançado. Uma pequena proporção mostrou uma transcrição acentuada na ausência de amplificação (RIOU, 1985). Embora em cânceres limitados a cérvix um nível baixo de amplificação foi detectado numa pequena proporção de tumores.

Um novo subtipo de HPV-6 (HPV-6vc) foi isolado de um carcinoma vulvar verrucoso raro que desenvolveu-se a partir de um condiloma (RANDO, 1986).

Análises feitas com o DNA viral mostraram um genoma ligeiramente maior que o protótipo de genoma HPV-6b. O aumento no tamanho foi localizado na região não codificada do vírus que contém as seqüências regulatórias transcricionais. Uma comparação nas seqüências de DNA nesta região entre o HPV-6b e HPV-6vc revelou números diferentes, incluindo 3 inserções de 75, 19 e 15 nucleotídeos, bem como mudanças no nucleotídeo 11.

As seqüências do genoma do HPV-6vc não demonstraram uma freqüência similar de mudanças dos nucleotídeos na região codificadora de proteínas (RANDO, 1986). Por razões desconhecidas, a região não codificadora do HPV-6vc parece ter sofrido modificações consideráveis; outro subtipo novo do HPV-6 (HPV-6d) foi isolado de um condiloma gigante de BUSHKE-LOWENSTEIN (BOSHART, 1986).

Este DNA viral tem uma grande duplicação dentro da região não codificadora. A função desta duplicação não é clara, mas é possível que nos dois vírus as mudanças na região não codificada resultem num aumento da transcrição dos genes virais. Uma comparação entre a atividade transcripcional do HPV-6b e HPV-6vc mostrou-se a nível transcripcional 3 vezes maior para o HPV-6vc. Se a atividade de transcrição aumentada do HPV-6vc sobre aquela do HPV-6b resulta em uma alta concentração dos polipeptídeos da região E, então o efeito oncogênico do HPV-6vc pode ser análogo a tumorigenicidade que ocorre através da expressão aumentada dos oncogenes celulares (BISHOP, 1983)

1.2.7 Suscetibilidade Genética

As afecções malignas associadas ao HPV provavelmente têm uma base genética, assim como o câncer de cólon e o de mama. O exemplo mais contundente é a epidermodisplasia verruciforme na qual há uma grande suscetibilidade genética para um grande número de tipos de HPV (LUTZNER, 1978). Pacientes com esta doença desenvolvem lesões planas e maculares generalizadas antes da adolescência. Muitas pacientes portadoras desta doença têm resposta imune celular discreta ou moderada. Esta doença é caracterizada também pelo desenvolvimento de carcinoma, no lugar das lesões virais, usualmente na pele exposta à luz solar. Há alguma dúvida se esta doença é ou não causada pelo HPV pelas seguintes razões:

- a) foram documentados vários casos de auto-inoculação com cânceres desenvolvendo-se dentro das lesões secundárias;

- b) um tipo de HPV associado com a epidermodisplasia verruciforme foi encontrado no câncer;
- c) um tumor primário e sua metástase, no mesmo paciente, continham o mesmo tipo de seqüências do HPV.

Os tipos de HPV próprios da epidermodisplasia verruciforme têm uma distribuição mundial, mas um reservatório ainda não foi encontrado na população geral. Por enquanto, ao menos um tipo de HPV 5 foi encontrado em pacientes submetidos a transplantes renais, sugerindo que a imunossupressão pode ser necessária para produzir a infecção viral (LUTZEN, 1980). Então a epidermodisplasia vem a ser uma doença genética que resulta em aumento da suscetibilidade para uma pequena população de HPV.

Um estudo recente mostrou que o câncer cervical é encontrado com maior freqüência em mães e irmãs de mulheres portadoras desta doença do que na população geral (FURGGIK, 1986). Esta tendência familiar sugere que alguns cânceres cervicais devem ter um componente genético primário, como na epidermodisplasia verruciforme, onde uma suscetibilidade individual progride para a doença invasiva e pode depender do tipo do HPV infectante. Alternativamente este fator familiar pode refletir um defeito genético no sistema imune, resultando numa incapacidade para reconhecer os antígenos do HPV ou para ter uma resposta pronta contra eles. Então as lesões cervicais induzidas pelo HPV persistiriam nesta população e estariam expostas a fatores secundários por um longo período de tempo.

Aproximadamente 14.000 casos de carcinoma invasivo e 45.000 casos de carcinoma *in situ* ocorrem anualmente nos E U A. Nem todos surgem devido a um *screening* inadequado pela técnica de Papanicolaou.

Há evidências sugerindo que alguns casos de câncer cervical não se comportam de maneira tradicional, isto é, levando um intervalo de tempo de 5 a 7 anos para a evolução das formas intra-epiteliais até as invasivas. Programas de *screening* citológicos repetitivos revelaram que alguns casos de câncer

cervical podem desenvolver-se rapidamente, pois alguns deles foram observados em meio a mulheres que eram portadoras de exames citológicos que não continham atipias (FIGGE, 1970). A frequência de casos que se desenvolvem rapidamente está em torno de 25 a 33% (DUNN, 1981 e DUNN, 1984). O intervalo médio entre a última citologia negativa até o diagnóstico de carcinoma *in situ* ou invasivo foi de aproximadamente 2 anos. Não foi possível observar alguma característica que identificasse a mulher de risco para o desenvolvimento rápido. Em um estudo feito com mulheres de nível sócio-econômico alto, foram identificados casos de crescimento rápido apesar destas pacientes serem consideradas de baixo risco para o câncer cervical.

Nenhum estudo epidemiológico foi feito para a caracterização do grupo de risco para o crescimento rápido do carcinoma cervical uterino.

1.2.8 Métodos para o diagnóstico do Papiloma Vírus Humano

Os métodos utilizados para a identificação do papiloma vírus humano são:

- a) colposcopia;
- b) microscopia ótica;
- c) microscopia eletrônica;
- d) demonstração do antígeno do HPV pela imunohistoquímica;
- e) biologia molecular.

1.2.8.1 Colposcopia

O exame colposcópico desempenha um importante papel tanto no diagnóstico como no manejo da infecção pelo HPV. A elevada acuracidade na predição do diagnóstico histopatológico, dentro do espectro que vai desde as formas sub-clínicas da infecção pelo HPV até as modificações correspondentes às CIN, pode ser obtida através de um sistema de graduação dos aspectos colposcópicos.

O primeiro sistema de graduação foi proposto por COPPLESON em 1976. A graduação era feita da seguinte maneira:

- a) Grau I= insignificante, não suspeito. Presença de epitélio branco plano, usualmente semi-transparente, com padrões bem definidos e ausência de vasos atípicos, distância intercapilar pequena;
- b) Grau II= significativa, suspeito. Presença de epitélio branco com grau de opacidade maior, acompanhado por bordas bem delimitadas, ausência de vasos atípicos;
- c) Grau III= altamente significativa, muito suspeito. Presença de epitélio branco muito opaco, acinzentado, com superfície irregular, presença de epitélio microexofítico.

Em 1984, REID e colaboradores propuseram um novo esquema menos subjetivo, especialmente no que diz respeito às lesões menores, o qual foi elaborado a partir de um esquema de pontuação. Geralmente quanto mais verrucosa era a aparência da lesão, menor era a pontuação.

Mais recentemente em 1985, REID e SCALZI propuseram uma nova graduação, desta vez levando em conta também o contorno das margens periféricas das lesões. Este índice de pontuação tem uma acuracidade de 97% em predizer os achados histopatológicos.

1.2.8.2 Microscopia Ótica

Segundo NAIB (1983), os fenômenos degenerativos que se fazem presentes tanto ao nível de núcleo como de citoplasma são comuns a todas as infecções virais. O citoplasma exibe alteração na coloração e a vacuolização, que no início é periférica e pequena, progride chegando mais tardiamente à

balonização, a qual indica grave dano celular, podendo-se observar também corpos de inclusão citoplasmáticos.

Ao nível de núcleo, as mudanças podem ser mais chamativas. O edema e a tumefação, com aumento inicial do nucléolo, que posteriormente entra em um processo degenerativo juntamente com o aparecimento de espaços intranucleares, cromatina amorfa, espessamento da membrana nuclear, fizeram com que durante muito tempo estes achados fossem denominados erroneamente como CIN nos laudos de citologia.

Outros achados que podem sugerir etiologia viral são: presença de corpos de inclusão com halo, cariorréxis, vacuolização nuclear, bi ou multinucleação, deposição irregular da cromatina e fenômenos de hiper ou paraceratose. Ainda que estas alterações possam estar presentes em outras infecções, a ausência de um agente causal no esfregaço, acompanhada de alterações mencionadas acima permitiriam sugerir infecção viral.

Segundo autores como BIBBO e WEID em 1973, FERNÁNDEZ-CID et alii em 1976 e MEISELS em 1976, os achados citológicos compatíveis com infecção viral seriam os seguintes:

- a) os esfregaços parecem mal corados com uma eosinofilia mais para o vermelho do que para o laranja. Os fenômenos mais pronunciados são a presença de disceratose e de escamas anucleadas. O componente inflamatório não é chamativo;
- b) em termos de núcleo, é observada a multinucleação principalmente nas células das camadas intermediárias e profunda. A cromatina é irregular, os nucléolos são evidentes e ocasionalmente são visualizados grupos de células profundas com núcleos hipercromáticos;
- c) dentre as características citoplasmáticas, há duas que se repetem com frequência: a presença de formação vacuolar mais ou menos grande, única ou múltipla, conhecida como coilocitose manifestada como halo claro perinuclear e a existência de picnose como consequência da

tendência degenerativa do núcleo. A metacromasia é freqüente nestes esfregaços.

O estudo citopatológico com coloração de Papanicolaou tem falhas no diagnóstico de infecção pelo vírus do papiloma; a taxa de especificidade é boa enquanto a cifra de sensibilidade é baixa. Apesar disto os resultados positivos determinam por si só um grupo de risco na população geral para as neoplasias intra-epiteliais cervicais (ZANINI-KOSLINSKI, 1992).

As alterações citológicas dependem da localização anatômica da lesão. Em todas as lesões, os efeitos citopáticos estão usualmente presentes em algumas células epiteliais. É possível que algumas células possam ser infectadas numa maneira não permissiva ou possam não ser infectadas ao todo. As inclusões citoplasmáticas patognomônicas das lesões causadas pelo HPV 1 são devidas ao acúmulo do produto genético E4. É interessante notar que, nas lesões da epidermodisplasia verruciforme com potencial maligno, achados morfológicos distintos podem ser observados. Em lesões benignas associadas ao HPV 3 e HPV 10, o grau de hiperkeratose e papilomatose é muito diferente quando comparado com lesões capazes de progredir para carcinoma e associadas com HPV 5 e HPV 8 (CROISSANT et alii, 1985).

Análises de esfregaços cérvico-vaginais têm mostrado que tipos específicos de células com coilócitos e disqueratócitos são patognomônicas de infecção pelo HPV.

O chamado condiloma atípico se diferencia citologicamente do condiloma comum e das CIN pela presença de células escamosas com marcantes atipias nucleares (MEISELS et alii, 1981).

Há evidências, baseadas nos achados citológicos, de que lesões associadas com o HPV 6-11 são diferentes das produzidas pelo HPV 16. Os

HPV 6-11 estão associadas com o condiloma acuminado comum enquanto o HPV 16 é encontrado nos condilomas atípicos (MEISELS e MORIN, 1981).

Análises feitas em lesões produzidas por tipos conhecidos de HPV revelaram que condilomas planos com atipia nuclear confinados às células superficiais estavam infectadas pelos HPV 6 e 11. Nas atipias nucleares encontradas em todas as camadas celulares do epitélio, o tipo de vírus visualizado foi o HPV 16, detectado em 15 de 18 biópsias realizadas por CRUM et alii em 1985.

Estes achados contrastam com outro estudo no qual nenhuma predileção pelos tipos de HPV foi demonstrada (KADISH et alii, 1986). Nos cortes histológicos de lesões anogenitais, o condiloma acuminado causado pelos HPV tipo 6 e 11 mostrou uma combinação distinta de papilomatose, acantose, coilocitose e hiper ou paraceratose.

A papulose bowenóide do pênis e da vulva aparecem como neoplasia intra-epitelial vulvar e peniana grau III e está associada ao HPV 16 em mais de 90% dos casos. A atipia nuclear envolve toda a espessura epitelial. A coilocitose está ausente na doença de BOWEN.

Em meio às lesões do canal anal que apresentavam hiperplasia epitelial focal, células consideradas patognomônicas da infecção viral foram encontradas. Estas mostraram degeneração nuclear do tipo balonização (PRAETORIUS-CLAUSEN, 1969). Este efeito citopático pode ser específico para o HPV 13 que é o mais comumente encontrado na hiperplasia epitelial focal.

1.2.8.3 Microscopia Eletrônica

As partículas do papiloma vírus humano foram primeiramente encontradas em suspensão de células de verrugas vulgares por STRAUSS, 1949, e através da microscopia eletrônica de transmissão de secções tissulares em 1962 por ALMEIDA e colaboradores.

O vírus é caracterizado por partículas icosaédricas que consistem em 72 capsômeros e medem aproximadamente 55µm de diâmetro. Os vírions estão arranjados como cristais e dispersos pelo núcleo. Depois da ruptura da membrana nuclear, os vírions podem também fazer-se presentes no citoplasma. A concentração das partículas virais variam consideravelmente nos vários tipos de verrugas, as plantares e as vulgares mostram o maior número de partículas virais, seguidas pelas verrugas planas, enquanto as verrugas comuns contêm baixa concentração de vírus (LOURENT et alii, 1975). Ocasionalmente neste último grupo de verrugas, partículas virais podem ser encontradas.

A concentração de partículas também está relacionada com a idade da lesão. Verrugas com 6 a 12 meses de evolução contêm o número mais alto de partículas virais, mas também podem ser observadas diferenças na concentração das mesmas em lesões com a mesma idade (BARRERA-ORA et alii, 1962).

Em comparação com as lesões cutâneas, um número baixo de partículas foi encontrado nas verrugas penianas e nas vulvares (DUNN e OLGIVIE, 1968).

De acordo com ORIEL e ALMEIDA em 1970, partículas virais foram encontradas em cerca de 50% dos condilomas acuminados da genitália externa feminina.

Cortes de tecido e esfregaços citológicos obtidos de condilomas cervicais foram examinados mais recentemente por vários investigadores. Partículas

virais foram identificadas em metade dos casos principalmente no núcleo das células coilocitóticas e ocasionalmente também nas células disceratóticas, enquanto as CIN III e os carcinomas cervicais invasivos foram negativos em todos os estudos. Isto também ocorreu no trato genital externo onde, em 4 de 9 casos de neoplasia intra-epitelial vulvar grau III (VIN III), somente áreas adjacentes que não mostravam displasia continham partículas virais (PILOTTI et alii, 1984).

Recentemente partículas de HPV foram demonstradas no epitélio cervical que não apresentava efeito citopático do HPV tanto histologicamente quanto colposcopicamente (SYRJANEN et alii, 1983). Partículas virais foram demonstradas repetidamente em lesões de cavidade oral como condiloma, papiloma escamoso e hiperplasia epitelial focal.

Em cerca de 10% dos papilomas da laringe, partículas de HPV foram encontradas por vários investigadores. Há um único caso reportado de partículas virais presentes num papiloma de pálpebra (ANGEVINE et alii, 1981).

1.2.8.4 Demonstração do Antígeno HPV pela Imunohistoquímica

A disponibilidade de anti-soros que reagem contra tipos específicos de papiloma vírus humano é limitada (PFISTER e zur HAUSEN, 1978).

Desde que os papilomas vírus não podem crescer em cultura tissular, a única fonte de partículas virais que podem ser utilizadas como antígenos encontra-se em meio a material clínico. Há entretanto uma variação considerável na proporção de replicação para os diferentes tipos de HPV *in vivo*.

Quantidades suficientes de partículas virais podem ser colhidas somente no caso do HPV 1, 2, 3, 4 e na epidermodisplasia verruciforme. Através destas,

anti-soros tipo-específicos foram preparados (ORTH et alii, 1980 e JABLONSKA et alii, 1982).

Anti-soros não tipo-específicos têm sido preparados da seguinte maneira:

- a) um grupo de tecidos oriundos de diferentes lesões produzidas por HPV é preparado e anticorpos contra os antígenos externos dos vírions são gerados (PYRHONEN e PENTTINEN, 1972);
- b) tecidos homogeneizados obtidos de tumores causados pelo mesmo tipo de HPV são usados como antígeno. Anticorpos diretamente contra antígenos estruturais virais e antígenos de superfície das células epidérmicas transformadas pelos vírus foram produzidos;
- c) complementarmente, anticorpos comuns grupo-específicos podem ser preparados usando partículas de HPV 1, CRPV *cottontail rabbit* ou papiloma vírus bovino, BPV, que são quebradas pelo tratamento com um detergente; antígenos internos ou externos são expostos como alvos para a produção de anticorpos (JENSON et alii, 1980).

Utilizando-se anti-soro contra estes antígenos comuns ou tipo-específicos, tecidos fixados rotineiramente ou através da congelação podem ser analisados. Se o anti-soro primário é produzido no coelho, ele reage com uma imunoglobulina anticoelho como um anticorpo secundário.

Para visualizar uma reação positiva, um complexo pode ser formado com a peroxidase-antiperoxidase (PAP), avidina biotina (ABC) ou imunofluorescência indireta (STERNBERGER, 1974 e GUPTA et alii, 1983).

Os papilomas cutâneos de diferentes áreas são positivos pela imunohistoquímica em mais de 50% (BRAUN, 1983) e verrugas comuns são positivas em quase 90% dos casos (MEHREGAN e NADJIN, 1984) utilizando-se a técnica da PAS. Ao contrário, lesões pré-malignas, como doença de Bowen, são negativas para o antígeno do HPV em 8 e em 5 casos respectivamente (BRAUN, 1983 e GROSS, 1984).

Observações idênticas foram feitas nas lesões da epidermodisplasia verruciforme, onde os antígenos de HPV podem somente ser demonstrados em lesões benignas (LUTZNER et alii, 1984).

Os condilomas cervicais mostraram uma reação positiva para o antígeno de HPV em 50% dos casos (FERENCZY, 1981).

Exames nas amostras com CIN demonstraram a proporção inversa de achados em relação a gravidade da lesão. A presença do antígeno do HPV em carcinomas invasivos da cérvix é excepcional. A mesma correlação foi observada nas lesões genitais externas. Entre 50 a 77% dos condilomas acuminados são positivos para o antígeno do HPV, comparando com não mais que 10% das VIN (CRUM, 1982b e PILOTTI, 1984).

Entre 18 a 48% dos papilomas laríngeos examinados por vários investigadores foram positivos para o antígeno do HPV. Lesões da cavidade oral foram estudadas por vários investigadores. Entre 40 a 60% das lesões da cavidade oral como condilomas e papilomas de células escamosas foram positivas para o antígeno do HPV (ORTH, 1979).

A hiperplasia epitelial focal é positiva para o antígeno do HPV em 80% dos casos. Há uma alta prevalência de tecidos adjacentes a carcinomas de células escamosas que vem a ser positivos para o antígeno do HPV em 50% dos casos, e um estudo mostrou a presença do antígeno do HPV em 4 de 6 carcinomas (LONING, 1985).

Nos papilomas de células escamosas do esôfago, mais de 31% dos casos são positivos para o antígeno do HPV. Há casos relatados na literatura de detecção dos antígenos do HPV nos papilomas de células escamosas do seio paranasal (SYRJANEN et alii, 1983) e da conjuntiva (VOLCKER e HOLBOCH, 1985).

Quanto à distribuição dos antígenos e à sensibilidade da técnica, várias observações foram feitas como:

- a) todos os tecidos mostraram reações positivas principalmente nas camadas epiteliais superiores e especificamente no núcleo dos coilócitos e disceratócitos;
- b) células adjacentes com características morfológicas idênticas são freqüentemente negativas. Esta observação sugere que as chances de detectar núcleos positivos aumenta com o número de biópsias. O índice de coloração positiva foi de 55% com uma biópsia e de 100% com 4 ou mais biópsias (LACK, 1980);
- c) quando as biópsias que são positivas para o antígeno do HPV são analisadas ultra-estruturalmente, partículas de HPV são usualmente identificadas (JENSON, 1980 e ENG, 1985).

A baixa sensibilidade e a falha na detecção de tipos específicos de papiloma vírus com a técnica do anticorpo comum não grupo específico necessitaria de outros reagentes tipo específicos. O uso de anticorpos monoclonais diretamente contra vírions desintegrados vem a ser uma possibilidade que já se encontra disponível para o grupo de papiloma vírus bovino (GONA, 1985).

Como um número de genomas de HPV já foi seqüenciado, uma outra maneira seria a produção *in vitro* das proteínas e peptídeos do HPV usando vetores de expressão adequados (REMAUT, 1983).

Os anticorpos monoclonais contra estes antígenos produzidos *in vitro* podem ser preparados como mostrado recentemente pela expressão da proteína E 6 da região não codificada.

1.2.8.5 Demonstração do HPV através dos métodos de Biologia Molecular

Os métodos de biologia molecular para detecção do DNA são os seguintes:

- 1) Southern blot;
- 2) Northern blot;
- 3) Dot spot;
- 4) Hibridização *in situ* pelo filtro (FISH);
- 5) Hibridização *in situ*;
- 6) Reação em cadeia da polimerase.

1) Southern blot

Esta técnica foi descrita por SOUTHERN em 1975 e é uma das mais usadas para a identificação do DNA viral nas células ou tecidos. O material a ser analisado pode permanecer congelado por vários anos.

O DNA da célula é extraído após a digestão das proteínas e do RNA. O DNA é segmentado usando-se diferentes endonucleases de restrição e separado pela eletroforese em gel de agarose. O DNA é então transferido (*blotted*) sobre uma membrana de hibridização. O DNA viral clonado e classificado como tendo componentes radioativos ou não é hibridizado para o DNA celular no filtro em diferentes temperaturas abaixo da temperatura de fusão.

Através das variações na concentração de formamida e NaCl, na temperatura e também no tamanho da sonda de DNA, diferentes níveis de adstringência podem ser aplicados de acordo com o propósito do experimento. A condição de baixa adstringência pode ser aplicada para a identificação de DNA viral idêntico (temperatura média 18C°). Após 2 a 4 dias de hibridização a membrana é lavada, secada ao ar e exposta para autorradiografia durante vários dias. Marcadores não radioativos são visualizados através de

uma reação apropriada. De 0,1 a 0,01 genomas de HPV equivalentes por célula podem ser detectados.

A modificação deste método (hibridização reversa) pode ser usada quando fragmentos tissulares procedentes de biópsias têm que ser investigados para a prevalência dos diferentes DNA virais em um experimento de hibridização. Depois da digestão, o DNA celular é caracterizado e hibridizado para os DNA virais clonados, os quais tinham sido previamente desnaturados e transferidos sobre a membrana (GISSMANN, 1985 e DE VILLIERS, 1986). Isto permite a detecção de cerca de 10 genomas virais equivalentes por célula, e tipos conhecidos de HPV podem ser distinguidos através de sinais de hibridização fracos ou fortes.

2) Northern blot

Esta técnica é usada para a detecção do RNA e difere da descrita acima nos seguintes pontos segundo THOMAS em 1980 e SEED em 1982. O RNA celular é extraído e separado em um gel desnaturante que contém formaldeído ou hidróxido de metil-mercúrio. Então, estruturas secundárias do RNA são desnaturadas e moléculas lineares são obtidas. Para a hibridização, tanto o RNA como o DNA caracterizados podem ser usados, e altas concentrações de adstringência têm de ser aplicadas porque as moléculas realinhadas de RNA são mais estáveis que os híbridos DNA/DNA (COX et alii 1984).

Usando este método, o RNA do HPV é identificado em tecidos e linhagens celulares de carcinoma cervical (SCWARTZ et alii, 1985 e YEE et alii, 1985).

3) Dot spot

Em contraste com a análise pelo Southern blot, o DNA celular totalmente extraído pelo fenol/clorofórmio não é digerido com endonuclease de restrição. Ele pode ser:

- a) colocado em um gel desnaturado e transferido sobre uma membrana (CUNNINGHAM, 1983);
- b) desnaturado pelo aquecimento e tratamento alcalino e transferido diretamente sobre uma membrana (KAFATOS, 1979).

Como o diâmetro destas manchas pode ser pequeno, tendo poucos milímetros, é possível testar muitos espécimes em um só filtro. O *screening* citológico de mulheres que são negativas mostraram 1.3 a 11% de espécimes positivos para o HPV (WICKENDEN, 1985 e PRATILI, 1986).

A sensibilidade e especificidade destes métodos sob condições de adstringência dão resultados satisfatórios, enquanto a hibridização sob condições de baixa adstringência pode resultar em achados falso-positivos, devido à hibridização cruzada com outras seqüências celulares. Isto vem a ser provavelmente o responsável pela alta concentração de DNA celular não digerido numa pequena área do filtro.

4) Hibridização *in situ* pelo filtro (FISH)

Este método de investigação permite o exame de várias amostras em um só experimento (WAGNER, 1984).

Células são filtradas sobre membranas, lisadas e desnaturadas pelo tratamento alcalino. Depois da neutralização e cozimento, elas podem ser estocadas por vários meses. A hibridização é feita sob condições de alta adstringência com HPV 11 (o qual também detecta o HPV 6 com uma eficiência um pouco menor) e uma mistura de HPV 16 e HPV 18. Outros DNA virais podem ser usados neste sistema de hibridização. Depois de lavar, a autorradiografia é feita e o resultado pode ser lido após 1 a 5 dias.

Procedimentos feitos com esfregaços cérvico-vaginais positivos permitem uma detecção do HPV num índice de 60 a 70% (SCHNEIDER, 1987).

Mais de 10.000 mulheres citologicamente negativas foram estudadas por este método em um trabalho, e 12% mostraram-se positivas em proporções iguais para o HPV 6/11 e HPV 16/18 (SOUSA, 1990).

5) Hibridização *in situ*

A técnica da hibridização *in situ* permite a detecção de seqüências de DNA ou RNA em preparações citológicas ou cortes de tecidos. Tanto o material obtido por congelamento como aquele fixado pode ser usado, e durante o procedimento a morfologia do tecido pode ser preservada.

O DNA ou RNA complementar, caracterizados química ou radiologicamente, são usados como sondas. Os cortes são colocados em lâminas úmidas.

Durante o pré-tratamento, o DNA e o RNA celular são expostos e desnaturados, uma certa quantidade de DNA ou RNA caracterizados são aplicados e a hibridização é realizada durante 12 a 48 horas dependendo da atividade específica e da concentração das sondas. De acordo com a adesividade requerida pela reação, as condições de lavagem são selecionadas e as laminas são processadas para a autorradiografia (GALL, 1971).

A hibridização *in situ* para a detecção do papiloma vírus foi usada inicialmente no papiloma de SHOPE em cortes obtidos por congelamento, usando sondas de RNA tritiada e analisadas através da microscopia ótica e eletrônica (ORTH, 1971).

Estudos realizados em material humano revelaram que em lesões benignas a replicação do DNA viral precede a produção de proteínas do capsídeo e é primeiramente detectada na camada parabasal (ORTH, 1980).

A hibridização *in situ* também demonstra que o início da replicação viral do DNA coincide com o surgimento dos efeitos citopáticos, mostrando uma interferência da replicação do DNA viral com a expressão dos produtos fisiológicos da ceratinização (CROISSANT, 1985).

Usando sondas de DNA biotiniladas, em 40% de 42 carcinomas anogenitais foram encontrados os DNA dos HPV 16 e 18 (BECKMANN, 1985) e, em meio as neoplasias intra-epiteliais cervicais, 10 das 16 lesões foram positivas para o HPV 16 (CRUM, 1986). Este método tem a vantagem de evitar a radioatividade, mas uma baixa sensibilidade foi encontrada pois há necessidade da presença de 800 cópias virais para dar positividade. Uma sensibilidade maior é obtida quando sondas assimétricas de RNA são utilizadas as quais têm uma grande atividade específica e previnem os auto-rearranjos das sondas (COX, 1984). Através deste procedimento podemos fazer a diferenciação entre DNA e RNA viral durante a detecção.

6) Reação em cadeia da polimerase

Esta técnica permite amplificar enzimaticamente quantidades mínimas de DNA viral, portanto vem a ser uma técnica dotada de alta sensibilidade, mas que requer tecnologia muito complicada.

Uma segunda vantagem deste método é que ele pode ser usado em material já incluído na parafina, porém ela poderá também gerar resultados falso-positivos por contaminação durante a sua realização.

1.2.8.6 Indicações para o uso dos diferentes métodos de Hibridização

- Southern blot

a) Caracterização do DNA viral.

Este método mostra a mais alta sensibilidade (0,01-0,1 cópias por célula) e especificidade. Como ele permite um padrão típico de restrição dependendo do número de cortes no genoma viral, diferentes tipos de HPV podem ser identificados.

b) Caracterização do DNA celular

A reação de Southern blotting reversa tem uma sensibilidade acurada e é capaz de detectar cerca de 10 cópias por célula. Ele vem a ser o método ideal de *screening* para a análise do material, que é passível de conter uma grande variedade de diferentes tipos de HPV já definidos atualmente. A detecção do DNA viral pode ser feita em um único experimento.

- Dot (spot) blot

Este método tem a capacidade de alcançar uma cópia por célula e um grande número de espécimes pode ser estudado em um curto intervalo de tempo. A hibridização é feita somente sob condições de alta adstringência, desta maneira uma alíquota de cada espécime tem que ser hibridizada para cada tipo de HPV separadamente. Este método é indicado quando o material vai sofrer investigação para um limitado número de tipos de HPV.

- Hibridização *in situ* pelo filtro

Em comparação com o dot blot existe somente uma diferença em termos de sensibilidade com esta técnica. As indicações e a especificidade são iguais. Cerca de 105 moléculas de DNA viral podem ser detectadas em um espécime se ele estiver concentrado em uma célula ou em um grupo de células, resultando numa mancha negra no autorradiograma. Num *swab* cervical contendo 2×10^5 células e somente uma célula infectada com 104 cópias de DNA viral, tanto a Southern quanto a Dot blot não seriam sensíveis o bastante para a sua detecção. Por outro lado, a hibridização *in situ* pelo filtro não pode detectar células contendo um baixo número de moléculas de DNA viral, apesar do fato de todas as células poderem ser infectadas (1 em cada 2×10^5 células).

- Hibridização *in situ*

Dependendo do método usado, a sensibilidade varia entre 20 a 100 cópias por célula (caracterização radioativa) e entre 200 a 800 cópias por célula (caracterização pela biotina). Os dois métodos ainda não são aplicados em grande escala, mas eles são a única escolha quando características morfológicas associadas a diferentes tipos de HPV têm que ser identificados. Uma vantagem adicional do método é que pode ser aplicado em material de arquivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DOS CASOS

Foram analisados, retrospectivamente, 28 colos uterinos de fetos e/ou natimortos submetidos à necropsia no Hospital Lyndon B Johnson, Houston, Texas, no período compreendido entre janeiro de 1992 a dezembro de 1993.

De acordo com a presença ou não de infecção pelo HPV nas mães destes fetos e/ou natimortos detectada por estudos de hibridização molecular, estes 28 casos foram subdivididos em dois grupos:

- a) grupo 1- mães portadoras de DNA HPV;
- b) grupo 2- mães não portadoras de DNA HPV.

Retrospectivamente, através da análise dos prontuários, foram retiradas informações a respeito dos estudos citopatológicos dos esfregaços cervico-vaginais (Papanicolaou, 1943), dos estudos colposcópicos e das biópsias colpodirigidas, quando se fizeram necessárias e cujos fragmentos para estudo histológico foram feitos segundo os critérios estabelecidos pelo Departamento de Patologia do Hospital Lyndon B Johnson. Também foi obtida informação quanto à integridade ou não da bolsa amniótica.

Todas as pacientes faziam acompanhamento no Setor de Pré-natal do Serviço de Obstetrícia do Hospital Lyndon B Johnson .

2.2 ESTUDO DOS COLOS UTERINOS FETAIS

2.2.1 Histopatologia

As necropsias dos fetos e natimortos seguiram protocolo estabelecido no Departamento de Patologia do Hospital Lyndon B Johnson.

Após a remoção dos órgãos, o colo uterino é isolado e fixado em formalina não tamponada. Correspondendo aos ponteiros de um relógio, 12 secções radiais de todo o colo são realizadas, processadas e emblocadas em parafina. Para cada bloco, secções de 5mm de espessura foram colhidas e coradas em hematoxilina e eosina. Os achados histológicos foram classificados como:

- a) normais ou metaplasia escamosa;
- b) sugestivo de infecção por HPV, condiloma acuminado ou neoplasia intra-epitelial grau I;
- c) neoplasia intra-epitelial grau II / III.

2.2.2 Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* seguiu a técnica conforme preconizada por WAGNER em 1984.

Resumidamente, cortes de 5mm das amostras emblocadas em parafina foram colhidas em lâminas de vidro tratadas com 3-aminopiltrietoxisilane (Life Technologies, Inc, Gaithersberg, M D) e desparafinizados em xileno antes do processamento da hibridização *in situ*. Secções de tecidos duplicadas, tendo cerca de 9mm de espessura (um a três por bloco), foram colocadas dentro de tubos fechados de centrífuga e preparados para a realização da PCR em procedimentos de rotina.

Secções de tecidos foram corados pela hematoxilina-eosina e enviados para estudo histológico. Os achados foram classificados como:

- a) normal /metaplasia escamosa;
- b) sugestivo de HPV/condiloma/neoplasia intra-epitelial grau I (CIN I);
- c) neoplasia intra-epitelial cervical grau II (CIN II)/neoplasia intra-epitelial grau III (CIN III).

A hibridização *in situ* do DNA do papilomavirus humano foi realizada nos cortes de tecido, seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante, utilizando 3 coquetéis de sondas de DNA marcadas com biotina com capacidade para reconhecer os tipos de HPV 6/11, 16/18, 31/33/35 (Vira Type In Situ, Life Technologies). Cada procedimento da hibridização incluiu uma sonda de controle positivo para o genoma do DNA humano e uma sonda de controle negativo para seqüências de DNA desconhecidas. As duas sondas já estavam inseridas no kit do fabricante. Secções de tecidos positivos para tipos de HPV conhecidos foram incluídas em cada procedimento.

O processo da hibridização *in situ* incluiu incubação do tecido desparafinado num reagente de digestão a 37C° durante 15 minutos, desnaturação do DNA alvo a 100C° durante 5 minutos, e hibridização com reagentes com sondas de biotina a 37C° durante 2 horas. Após a hibridização as secções foram postas em reação com o anticorpo antibiotina conjugado com fosfatase alcalina e esta desenvolveu-se usando-se 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato e tetrazol nitroblue.

2.2.3 Reação em cadeia da polimerase

Para a reação em cadeia da polimerase, secções de cerca de 9mm de espessura (uma a três por bloco) foram colocadas dentro de tubos de ensaio fechados e preparados para os procedimentos de rotina conforme Wright preconizou em 1990.

Alíquotas (10ml) das amostras preparadas foram amplificadas cerca de 40 ciclos, usando-se seqüências de primers de consenso do HPV L1 (MY11 e MY09, oligômero sintetizado por Synthecell Corp, Rockville, MD). Plasmídios recombinantes, contendo DNA dos HPV 6, 11, 16 e 18 (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany), e secções obtidas de conhecidos condilomas cervicais HPV-positivo foram usadas como controles positivos.

Primers de b-globina (PCO4 e GH20, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) ou primers de b-actina (500 pares de base, Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA) foram incluídos em cada ciclo de amplificação como um controle de amplificação. Os controles foram examinados para a verificação de uma possível contaminação.

Após a amplificação, as amostras foram avaliadas através da eletroforese em gel de agarose (18-mL de produto de reação), coradas pelo brometo de etídio, e foram visualizadas através da luz ultravioleta.

As amostras foram processadas subsequentelemente pela hibridização a Southern blot, usando-se oligômeros genéricos de HPV (MY 18, MY46, MY57 e WD 147. Os oligômeros foram sintetizados por Synthecell Corp., que são capazes de detectar um amplo espectro de tipos de HPV. Mais tarde, as amostras foram testadas através da hibridização com filtro com sondas específicas para os tipos de HPV 6/11, 16, 18 e 31/33/35. Para a realização da análise da hibridização as sondas foram marcadas usando-se trifosfato5-[g-P32] de adenosina (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) ou trifosfato-deoxiuridine-biotina. As sondas marcadas com o P32 foram detectadas pela autorradiografia e as sondas biotiniladas foram detectadas usando-se o sistema de luminescência química ECL (Amersham Life Sciences).

Os procedimentos de hibridização molecular foram realizados no Departamento de Virologia do M. D. Anderson Cancer Center na cidade de Houston, Texas.

2.3 ESTUDOS REALIZADOS NAS MÃES

2.3.1 Estudo citopatológico

O diagnóstico citopatológico foi realizado através de análise criteriosa das alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas das células colhidas no ectocérvice e canal cervical. Os esfregaços foram dispostos em duas lâminas, fixados em solução de álcool a 95% e corados pela técnica de Papanicolaou, 1943, conforme a rotina do Departamento de Patologia do Hospital Lyndon B Johnson. Os resultados foram dados conforme a classificação de Richart, 1969.

A análise da presença ou não de seqüências do DNA viral foram realizadas utilizando-se o método da reação em cadeia da polimerase como foi exposto acima.

2.3.2 Estudo colposcópico

Para a realização da colposcopia, foi utilizado um colposcópio binocular com conjunto óptico, munido de aumentos que variavam de 6x , 12x e 40x e de um filtro verde, que facilita a apreciação das atipias vasculares.

A bateria de soluções utilizadas na colposcopia alargada foi a seguinte:

- a) soro fisiológico a 0,9%, destinado à limpeza do colo uterino e das paredes vaginais, o que facilita o estudo detalhado de sua vascularização;

- b) solução de ácido acético a 2%, que é vasoconstritor, coagula as proteínas e realça o contraste entre os diferentes epitélios;
- c) solução iodo-iodurada de Schiller, que, aplicada na fase final do exame colposcópico, identifica as zonas iodo-negativas que denunciam uma diminuição da concentração do glicogênio celular, característica comum às células neoplásicas e às do epitélio cilíndrico glandular do endocérvice.

As imagens colposcópicas, registradas de maneira descritiva, foram classificadas neste estudo de acordo com a nomenclatura internacional instituída no II Congresso Mundial de Patologia Cervical e Colposcopia, em Graz, na Áustria, em 1975.

2.3.3 Estudo histopatológico

As biópsias foram realizadas sob a mira colposcópica em regime ambulatorial, com a utilização da pinça de Kevorkian, dispensando-se qualquer tipo de anestesia. Com finalidade hemostática, procedeu-se ao tamponamento vaginal cerrado, em todos os casos, mantendo-se a mecha de gaze por período de tempo variável entre 12 e 24 horas.

Os fragmentos de colo uterino, obtidos através de biópsia, foram imersos numa solução de formol a 10%; incluídos em parafina; submetidos a cortes de 5 micra; estendidos sobre a lâmina, para que fosse processada a coloração através da hematoxilina-eosina; e então examinados de acordo com as normas estabelecidas pelo Departamento de Patologia do Hospital Lyndon B Johnson.

2.3.4 Reação em cadeia da polimerase

Os esfregaços cérvico-vaginais foram processados de acordo com critérios especificados por Ghirardini em 1989. Resumidamente, após a remoção do esfregaço através da imersão no xilol durante cerca de 24 horas,

ele foi posteriormente tratado com a proteinase K a 0,05% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) numa solução tampão de fosfato salina num pH de 7.2 a 37C° durante 5 minutos.

A reação em cadeia da polimerase foi processada como descrita acima.

Todos os fragmentos tissulares foram analisados quanto a presença do DNA HPV pela reação em cadeia da polimerase como o procedimento descrito anteriormente.

Quanto à metodologia estatística empregada, utilizou-se a análise descritiva dos dados, através de tabelas e quadros.

A análise estatística foi aplicada na comparação dos grupos de mulheres com hibridização molecular do DNA HPV das células cervicais positiva (13 pacientes) e com a hibridização molecular do DNA HPV negativa (15 pacientes), e na comparação dos tipos de exames realizados, onde foram utilizados os testes paramétricos t de Student para amostras independentes e os testes não-paramétrico Qui-Quadrado e Fisher para amostras independentes.

O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5,0%. O teste de Fisher fornece a probabilidade exata da ocorrência.

3 RESULTADOS

Os resultados da análise dos 28 casos foram distribuídos em 12 tabelas e 3 quadros.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE FETAL NAS MULHERES COM TESTE DA HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

| IDADE FETAL (Semanas) | POSITIVA | | NEGATIVA | | TOTAL | |
|--------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| 32 | - | - | 01 | 6,7 | 01 | 3,6 |
| 33 | 01 | 7,7 | - | - | 01 | 3,6 |
| 34 | 04 | 30,8 | - | - | 04 | 14,3 |
| 35 | 02 | 15,4 | 02 | 13,3 | 04 | 14,3 |
| 36 | 05 | 38,5 | 06 | 40,0 | 11 | 39,3 |
| 37 | 01 | 7,6 | 05 | 33,3 | 06 | 21,4 |
| 38 | - | - | 01 | 6,7 | 01 | 3,5 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

NOTA: Não foi constatado alteração nos resultados do exame histopatológico (normal) realizado nos cones dos fetos, nos testes de hibridização *in situ* (negativa) e PCR (negativa) tanto nas mulheres PCR positiva, como naquelas com PCR negativa, para a presença de DNA HPV.

Na tabela estão relacionados a idade fetal e a presença ou não do DNA HPV nas células cervicais das respectivas mães. Cerca de 40% dos fetos tinham 36 semanas enquanto 3,5% estavam na 38^a semana.

TABELA 2 -DISTRIBUIÇÃO DA FAIXA ETÁRIA DAS MULHERES COM TESTE DA PCR

| FAIXA ETÁRIA (Anos) | POSITIVA | | NEGATIVA | | TOTAL | |
|------------------------|----------|------------|----------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Menos de 20 | 09 | 69,2 | 01 | 6,6 | 10 | 35,7 |
| 20 a 29 | 04 | 30,8 | 10 | 66,7 | 14 | 50,0 |
| 30 e mais | - | - | 04 | 26,7 | 04 | 14,3 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 2 podemos observar a distribuição da faixa etária quanto à presença ou não do DNA HPV nas células cervicais maternas. De um total de 28 pacientes, 13 eram positivas para o DNA viral, enquanto 15 tiveram seus resultados negativos na PCR. Cerca de 70% das pacientes positivas tinham menos de 20 anos, enquanto a maioria das pacientes sem o DNA viral estava na faixa etária compreendida entre 20 a 29 anos.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS NAS MULHERES COM TESTE DA PCR

| NÚMERO DE PARCEIROS | POSITIVA | | NEGATIVA | | TOTAL | |
|---------------------|----------|------------|----------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| 1 a 3 | 04 | 30,8 | 12 | 80,0 | 16 | 57,1 |
| 4 a 6 | 06 | 46,1 | 01 | 6,7 | 07 | 25,0 |
| 7 e mais | 03 | 23,1 | 02 | 13,3 | 05 | 17,9 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 3 observamos a correlação entre o número de parceiros e os resultados da PCR nas mães. Da maioria das pacientes positivas para o DNA viral, 47% referiam 4 a 6 parceiros, enquanto 80% das pacientes negativas relatavam 1 a 3 parceiros.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO INÍCIO DA ATIVIDADE SEXUAL (FAIXA ETÁRIA) NAS MULHERES COM TESTE DA PCR

| ATIVIDADE SEXUAL | POSITIVA | | NEGATIVA | | TOTAL | |
|------------------|----------|------------|----------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Menos de 15 | 09 | 69,2 | 01 | 6,7 | 10 | 35,7 |
| 15 a 19 | 04 | 30,8 | 03 | 20,0 | 07 | 25,0 |
| 20 e mais | - | - | 11 | 73,3 | 11 | 39,3 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 4 pode-se observar a correlação entre a faixa etária das mulheres no início da atividade sexual e a presença ou ausência do DNA viral. Cerca de 70% das pacientes positivas tiveram a coitardia com menos de 15 anos, enquanto no grupo de mulheres negativas a mesma deu-se com 20 anos ou mais.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO TABAGISMO NAS MULHERES COM TESTE DA PCR

| TABAGISMO (Nº de cigarros) | POSITIVA | | NEGATIVA | | TOTAL | |
|-------------------------------|----------|------------|----------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Não fuma | 04 | 30,8 | 09 | 60,0 | 13 | 46,4 |
| 1 a 10 | 08 | 61,5 | 06 | 40,0 | 14 | 50,0 |
| 11 a 20 | 01 | 7,7 | - | - | 01 | 3,6 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 5 observamos a correlação entre o tabagismo e a presença ou não do DNA viral nas mães. Não verificamos diferença significativa entre as mulheres tabagistas e a presença do vírus em relação às não tabagistas e à presença do mesmo.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO QUANTO À PARIDADE NAS MULHERES COM TESTE DA PCR

| PARIDADE | POSITIVA | | NEGATIVA | | TOTAL | |
|-------------|----------|------------|----------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Primigestas | 04 | 30,8 | 02 | 13,3 | 06 | 21,4 |
| Múltiparas | 09 | 69,2 | 13 | 86,7 | 22 | 78,6 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 6 pode-se observar a correlação entre a paridade e a presença ou não do DNA viral nas mães. Não existe diferença significativa entre primigestas ou múltiparas e a presença do vírus.

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DAS LESÕES CLÍNICAS DO HPV NAS MULHERES COM EFEITO CITOPÁTICO VIRAL E TESTE PCR

| LESÃO CLÍNICA (HPV) | EFEITO CITOPÁTICO VIRAL (ECV) | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | Positivo | | Negativo | | Total | |
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Presente | 06 | 60,0 | 01 | 5,6 | 07 | 25,0 |
| Ausente | 04 | 40,0 | 17 | 94,4 | 21 | 75,0 |
| TOTAL | 10 | 100,0 | 18 | 100,0 | 28 | 100,0 |

| LESÃO CLÍNICA (HPV) | PCR | | | | | |
|---------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | Positiva | | Negativa | | Total | |
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Presente | 07 | 53,8 | - | - | 07 | 25,0 |
| Ausente | 06 | 46,2 | 15 | 100,0 | 21 | 75,0 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 7 observamos que, dentre as pacientes com lesões condilomatosas clínicas, apenas uma não apresentou os efeitos citopáticos virais em seu esfregaço cérvico-vaginal, enquanto, por ocasião da realização do teste da PCR, todas as mulheres com lesão clínica apresentaram-se positivas. Das 21 pacientes com ausência de lesão clínica, 17 não apresentaram o efeito citopático viral. Quanto ao teste da PCR, em meio às 21 pacientes sem lesão clínica, cerca de 15 delas foram negativas.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DO RESULTADO DA PCR QUANTO AO TIPO DE BOLSA AMNIÓTICA

| BOLSA | HPV POSITIVA | | HPV NEGATIVA | | TOTAL | |
|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Íntegra | 06 | 46,2 | 09 | 60,0 | 15 | 53,6 |
| Rota | 07 | 53,8 | 06 | 40,0 | 13 | 46,4 |
| • 6 horas | 05 | 38,5 | 02 | 13,4 | 07 | 25,0 |
| • 12 horas | 01 | 7,7 | 02 | 13,3 | 03 | 10,7 |
| • 24 horas | 01 | 7,6 | 02 | 13,3 | 03 | 10,7 |
| TOTAL | 13 | 100,0 | 15 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 8 observamos que, nas 13 mulheres positivas, 54% tinham a bolsa rota por ocasião do parto, enquanto 47% tinham-na íntegra. Nas 15 mulheres negativas, 40% referiam bolsa rota por ocasião do parto, enquanto em 60% das pacientes a mesma estava íntegra. Portanto não houve significância quanto ao estado da bolsa e a presença ou não do DNA HPV na PCR.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS DE COLPOCITOLOGIA EM RELAÇÃO AOS ACHADOS DE HISTOPATOLOGIA

| GRAU DA ANATOMIA (Biópsia) | NORMAL | | ALTERADO | | | | TOTAL | |
|----------------------------|--------|------------|----------|------------|--------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | CIN I | | CIN II | | Número | Percentual |
| | | | Número | Percentual | Número | Percentual | | |
| Normal | 04 | 66,7 | - | - | - | - | 04 | 30,8 |
| Alterado | 02 | 33,3 | 04 | 100,0 | 03 | 100,0 | 09 | 69,2 |
| • CIN I | 01 | 16,7 | 02 | 50,0 | - | - | 03 | 23,1 |
| • CIN II | 01 | 16,6 | 02 | 50,0 | - | - | 03 | 23,1 |
| • CIN III | - | - | - | - | 03 | 100,0 | 03 | 23,0 |
| TOTAL | 06 | 100,0 | 04 | 100,0 | 03 | 100,0 | 13 | 100,0 |

Na tabela 9 observamos que, entre 6 mulheres com citologia oncótica normal, 67% delas tiveram exame histopatológico também normal. Das 4 pacientes com citologia CIN I, 100% apresentaram histopatologia CIN I. Nas 3 mulheres com citologia CIN II, 100% delas tiveram resultados de exame histopatológico CIN II.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS COLPOSCÓPICOS EM RELAÇÃO AOS ACHADOS DE HISTOPATOLOGIA

| HISTOPATOLOGIA (Biópsia) | NORMAL (ZTT) | | ALTERADA (ZTA) | | TOTAL | |
|-----------------------------|-----------------|------------|-------------------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual |
| Normal | - | - | 04 | 30,8 | 04 | 30,8 |
| Alterado | - | - | 09 | 69,2 | 09 | 69,2 |
| • CIN I | - | - | 03 | 23,1 | 03 | 23,1 |
| • CIN II | - | - | 03 | 23,1 | 03 | 23,1 |
| • CIN III | - | - | 03 | 23,0 | 03 | 23,0 |
| TOTAL | - | - | 13 | 100,0 | 13 | 100,0 |

Na tabela 10 observamos que, das 13 pacientes com ZTA, 70% tinham achados de histopatologia alterados.

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS DE COLPOCITOLOGIA EM RELAÇÃO AO TIPO DE VÍRUS ENCONTRADO NA PCR

| HPV DNA (Tipo de vírus) | NORMAL | | ALTERADO | | | | TOTAL | |
|----------------------------|--------|------------|----------|------------|--------|------------|--------|------------|
| | Número | Percentual | CIN I | | CIN II | | Número | Percentual |
| | | | Número | Percentual | Número | Percentual | | |
| Negativo | 15 | 68,2 | - | - | - | - | 15 | 53,6 |
| Positivo | 07 | 31,8 | 03 | 100,0 | 03 | 100,0 | 13 | 46,4 |
| • Tipo 6 | 01 | 4,5 | - | - | - | - | 01 | 3,5 |
| • Tipo 11 | 04 | 18,2 | 01 | 33,3 | - | - | 05 | 17,9 |
| • Tipo 16 | 02 | 9,1 | 02 | 66,7 | 03 | 100,0 | 07 | 25,0 |
| TOTAL | 22 | 100,0 | 03 | 100,0 | 03 | 100,0 | 28 | 100,0 |

Na tabela 11 observamos a relação entre os achados de citologia oncológica e os tipos de HPV, donde nas 22 pacientes com citologia normal, 18% acusavam a presença do HPV 11. Dentre as pacientes com citologia alterada, o tipo de HPV mais encontrado foi o HPV 16.

TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS EM RELAÇÃO AOS TIPOS DE HPV

| TIPOS DE DNA HPV | NORMAL | | ALTERADO | | | | | | TOTAL | |
|---------------------|--------|------------|----------|------------|--------|------------|---------|------------|--------|----------|
| | Número | Percentual | CIN I | | CIN II | | CIN III | | Número | Percentu |
| | | | Número | Percentual | Número | Percentual | Número | Percentual | | |
| Negativo | - | - | - | - | 02 | 100,0 | - | - | 02 | 15, |
| Positivo | 05 | 100,0 | 03 | 100,0 | - | - | 03 | 100,0 | 11 | 84, |
| • Tipo 6 | 01 | 20,0 | - | - | - | - | - | - | 01 | 7, |
| • Tipo 11 | 03 | 60,0 | - | - | - | - | - | - | 03 | 23, |
| • Tipo 16 | 01 | 20,0 | 03 | 100,0 | - | - | 03 | 100,0 | 07 | 53, |
| TOTAL | 05 | 100,0 | 03 | 100,0 | 02 | 100,0 | 03 | 100,0 | 13 | 100, |

Na tabela 12 podemos observar a correlação entre os achados histopatológicos e os tipos de HPV. Entre 5 mulheres com histopatologia alterada, o HPV11 foi presente em 60% dos casos, enquanto o HPV16 foi encontrado em 100% dos achados de histopatologia alterados.

QUADRO 1 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS FETOS, DAS MULHERES E DO INÍCIO DA ATIVIDADE SEXUAL EM RELAÇÃO À ESTATÍSTICA DESCRITIVA NA PCR

| IDADE | POSITIVA (n = 13) | | NEGATIVA (n = 15) | | TOTAL (n = 28) | |
|--|----------------------|-----|----------------------|-----|-------------------|-----|
| Idade fetal (semanas) | | | | | | |
| • Média \pm desvio padrão | 35,1 \pm | 1,2 | 36,1 \pm | 1,4 | 35,6 \pm | 1,4 |
| • Mínima e máxima | 33 e | 37 | 32 e | 38 | 32 e | 38 |
| Idade das mulheres (anos) | | | | | | |
| • Média \pm desvio padrão | 19,0 \pm | 3,3 | 27,8 \pm | 4,7 | 23,7 \pm | 6,0 |
| • Mínima e máxima | 15 e | 28 | 19 e | 36 | 15 e | 36 |
| Início da atividade sexual (anos) | | | | | | |
| • Média \pm desvio padrão | 14,0 \pm | 2,0 | 19,9 \pm | 2,5 | 17,1 \pm | 3,7 |
| • Mínima e máxima | 12 e | 18 | 14 e | 26 | 12 e | 26 |

QUADRO 2 - RESULTADO DO TESTE APLICADO NA COMPARAÇÃO DAS MULHERES
PCR POSITIVA EM RELAÇÃO ÀS MULHERES PCR NEGATIVA

| VARIÁVEIS | RESULTADO DO TESTE | TESTE APLICADO | VALOR TABELADO | SIGNIFICÂNCIA |
|-----------------------------------|--------------------|----------------|----------------|---------------|
| Idade fetal (semanas) | - 2,034 | t de Student | 2,06 (0,05) | NS |
| Idade das mulheres (anos) | - 5,780 | t de Student | 2,78 (0,005) | S |
| Número de parceiros sexuais | 0,0107 | Fisher | - | S |
| • 1 a 3 x 4 a 6 | 0,0114 | Fisher | - | S |
| Início da atividade sexual (anos) | - 6,843 | t de Student | 2,78 (0,005) | S |
| Tabagismo | 2,40 | Qui-Quadrado | 3,84 (0,05) | NS |
| • 1 a 10 x 11 a 20 | 0,0956 | Fisher | - | NS |
| Paridade | 0,1993 | Fisher | - | NS |

QUADRO 3 - RESULTADO DO TESTE APLICADO NA COMPARAÇÃO DOS TIPOS DE EXAMES REALIZADOS

| VARIÁVEIS | RESULTADO DO TESTE | TESTE APLICADO | VALOR TABELADO | SIGNIFICÂNCIA |
|---------------------------------|--------------------|----------------|----------------|---------------|
| Lesão Clínica (HPV) | | | | |
| • Efeito citopático viral (ECV) | 0,0032 | Fisher | - | S |
| • DNA HPV | 0,0014 | Fisher | - | S |
| PCR x Tipo de Bolsa | 0,2294 | Fisher | - | NS |
| • Íntegra | 0,60 | Qui-Quadrado | 3,84 (0,05) | NS |
| • Rota | 0,08 | Qui-Quadrado | 3,84 (0,05) | NS |
| Achados de Citopatologia | 0,08 | Qui-Quadrado | 3,84 (0,05) | NS |
| Achados de Histopatologia | 1,92 | Qui-Quadrado | 3,84 (0,05) | NS |
| PCR x achados de Citopatologia | 0,0046 | Fisher | - | S |
| PCR x achados de Histopatologia | 0,3590 | Fisher | - | NS |

4 DISCUSSÃO

Estudos recentes feitos com o papiloma vírus humano sugerem uma íntima associação de certos tipos deste com a presença da neoplasia intra-epitelial cervical e com o carcinoma francamente invasor (FRANCESCHI, 1983 e CRAWFORD, 1984).

As evidências surgiram com base em estudos histológicos e moleculares que mostravam uma associação freqüente do HPV com as neoplasias cervicais (FU et alii, 1983 e zur HAUSEN, 1977), e através de estudos epidemiológicos, os quais revelavam fatores de risco comuns para a infecção pelo HPV e para o câncer cervical, ambos atualmente rotulados como doenças sexualmente transmissíveis (SADEGHI, 1984).

O HPV pode contribuir para o desenvolvimento da neoplasia diretamente através das oncoproteínas virais, as quais interagiriam com as proteínas da célula, e indiretamente, agindo no sistema imunológico ou no genoma celular.

Os papilomas vírus são epiteliotrópicos. Existem cerca de 71 tipos diferentes isolados, sendo que pelo menos 27 destes têm assegurado um potencial oncogênico e podem ser agrupados em três diferentes categorias de risco: baixo, intermediário e alto.

Alguns estudos têm demonstrado incidência maior da infecção pelo HPV entre a população de gestantes, juntamente com uma evolução mais rápida das neoplasias intra-epiteliais cervicais em direção às formas invasoras do câncer (PASTNER, 1990).

A transmissão do vírus para o feto durante a sua passagem pelo canal do parto foi sugerida por SMITH em 1991. Entretanto, relatos de outros autores demonstram que crianças nascidas através de cesariana também exibem a presença do HPV, sugerindo ocorrer a transmissão viral intra-útero e que o

parto abdominal não é totalmente efetivo na proteção do concepto contra o referido vírus (TSENG, 1992 e JACYNTHO, 1994).

A confirmação da transmissão do HPV antes do nascimento e do período da gestação em que ela ocorre é fundamental. A análise criteriosa de material fetal nas diferentes fases do período gestacional poderia provar esta hipótese. O possível contágio das células embrionárias com o HPV faria delas produtoras virais e poderia dar início à transformação neoplásica das mesmas.

Em nosso estudo, os colos uterinos dos fetos e natimortos de 32 a 38 semanas, cujas mães apresentavam, nas amostras de células e tecidos cervicais, seqüências do HPV detectadas pela reação em cadeia da polimerase, não foi possível a demonstração da presença do DNA viral através da hibridização "in situ". O mesmo ocorreu com o estudo realizado pela reação em cadeia da polimerase.

Adicionalmente, com o estudo histológico destes colos uterinos, não foram observadas alterações sugestivas da presença do HPV, como também não foram evidenciadas alterações condizentes com a presença de neoplasia intra-epitelial cervical.

A hibridização "in situ" permite-nos a correlação entre a distribuição do DNA viral e o tipo de célula infectada, e é a técnica mais indicada em estudos retrospectivos (THOMPSON, 1992). Entretanto, trata-se de técnica que apresenta sensibilidade inferior, quando comparada com outras provas de hibridização molecular, e principalmente quando sondas biotiniladas são usadas (DEPALO, 1991).

Devido a estes aspectos técnicos, foi realizada também a reação em cadeia da polimerase com controles positivo e negativo seguida pela técnica de Southern blot que é atualmente considerada a mais sensível das provas de hibridização molecular (PRATILI, 1986), e os resultados foram coincidentes.

Em 1986 BENDER reportou que a frequência de verrugas genitais em crianças, desde recém-nascidos até adolescentes, havia crescido muito, fato corroborado por ROCK e colaboradores também em 1986.

Em 1980 STUMPF, estudando lesões verrucosas perineais em crianças, sugeriu que a transmissão do HPV poderia ocorrer durante a gestação através da via hematogênica ou ascendente, durante o nascimento ou logo após o parto.

Em 1993 ARMBRUSTER-MORAES sugeriu a presença de viremia e descreveu alguns sintomas os quais poderiam ser os pródomos da infecção pelo HPV. Se existe viremia, então a infecção por via hematogênica poderá dar-se com o vírus atravessando a barreira placentária, infectando os conceptos e podendo, através da sua inclusão nas células embrionárias, causar alterações na morfologia fetal (BARCELLOS, 1990).

Em nosso estudo não constatamos a presença do HPV nas células do colo uterino fetal, sugerindo que a transmissão intra-uterina não ocorre, ou que, se presente, a infecção pelo mesmo esteja numa fase ainda muito inicial, não dando alterações celulares que pudessem ser detectadas, seja através da microscopia ótica ou através da hibridização molecular. Salientamos que, pela própria dificuldade de amostragem, o número de casos é limitado, e que o estudo deve ser continuado com uma ampliação da amostra de maneira prospectiva e com pesquisa do DNA HPV no sangue materno, no líquido amniótico e na placenta.

As infecções pelo HPV são particularmente freqüentes entre 15 a 40 anos, correspondendo ao período de atividade sexual máxima, utilizações de anticoncepcionais hormonais, gestações e riscos maiores de infecções genitais (JACYNTHO, 1994). Em nossa amostra, observamos que a média de idade das pacientes com células cervicais, apresentando DNA viral, era de 19 anos, fato

concordante com a literatura (ORIEL, 1971), enquanto a média de idade das pacientes PCR negativas foi de 28 anos.

De acordo com estudos realizados por FUJIMOTO em 1985, as mulheres que apresentavam lesões condilomatosas tinham em sua história um número maior de parceiros em relação a população geral. Fato comprovado em nossa amostragem, onde 46 % das pacientes que tinham DNA HPV em suas células referiam 4 a 6 parceiros sexuais contra 1 a 3 parceiros em 80% das gestantes DNA HPV negativas.

O início precoce da atividade sexual deixaria a mulher mais vulnerável ao aparecimento das doenças sexualmente transmissíveis (ALVES, 1984), o que foi comprovado em nosso grupo de estudo, onde 70% das pacientes DNA HPV positivas iniciaram sua vida sexual com menos de 15 anos, contrapondo-se ao grupo DNA HPV negativas, onde 74% tiveram a sua primeira relação sexual com mais de 20 anos.

Autores como BURGER em 1993 e FEARON em 1992, concluíram que o tabagismo está associado com o decréscimo do antígeno apresentador das células de LANGERHANS no epitélio cervical normal, produzindo um defeito imunológico local, o qual facilitaria a infecção e a persistência do papiloma vírus humano. Este fenômeno seria diretamente proporcional ao número de cigarros consumidos diariamente. Em nossa amostra não encontramos significância estatística entre o uso do tabaco e a presença do DNA viral.

Quanto à relação entre paridade e presença do vírus na célula, não foi significativa em nossa amostra, fato concordante com os achados de literatura (PATSNER, 1987).

O diagnóstico citológico de infecção pelo HPV caracteriza-se pela presença de coilocitose, disceratose e anomalias nucleares (MEISELS e MORIN, 1982). Os esfregaços da infecção pelo HPV apresentam-se limpos,

com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório e com predominância de células disceratóticas e poucos coilócitos ou, ao contrário, predominância de coilócitos e escassez de células disceratóticas (DEXEUS, 1989). Autores sugeriram que as alterações citoplasmáticas observadas nos coilócitos provavelmente eram produzidas pelo HPV (AYRE, 1949 e DEGIROLAMI, 1967).

Em 1981, CASAS-CORDERO observou que as células coilocitóticas estavam sempre presentes dentro do epitélio, em todos os casos de condiloma nos quais as partículas virais foram encontradas. Porém, a presença dos coilócitos não implicaria necessariamente a presença do vírus.

As características citopatológicas não distinguem as várias formas clínicas, colposcópicas e histopatológicas da infecção, (ALMEIDA FILHO, 1994). Em nossa amostra, de um total de 7 pacientes com lesões clínicas decorrentes do HPV, 6 tinham diagnóstico citológico positivo para a presença do vírus, enquanto uma gestante não apresentou os critérios para a infecção em seu esfregaço. Este fato pode ser explicado pelos achados de CASAS-CORDERO em 1981, onde o autor conclui ser a coilocitose o resultado de modificações citoplasmáticas progressivas causadas pelo efeito citopatogênico do HPV.

As provas de hibridização molecular dos ácidos nucléicos são os únicos métodos capazes de determinar a presença do HPV com alta sensibilidade e especificidade (DE VILLIERS, 1992).

Sua principal finalidade é a identificação dos tipos ou sub-tipos do vírus presentes na infecção. Através deste método também é possível a detecção de seqüências de HPV em tecido onde não existe expressão clínica, ou seja, a infecção está em estado latente.

Em nosso grupo, observamos que, dentre 7 mulheres com lesão clínica condilomatosa, todas elas apresentaram resultados positivos na prova de

hibridização, enquanto nas 21 pacientes com ausência da doença clínica, 6 delas foram positivas na PCR e 15 tiveram seus resultados negativos.

Na correlação que fizemos entre o resultado da PCR nas gestantes e o estado da bolsa amniótica, se íntegra ou rota, verificamos que, dentre 13 mulheres com seqüências virais positivas, 53,8% tinham a bolsa rota, enquanto 46,2% apresentavam a mesma íntegra. Nas 15 mulheres DNA HPV negativas, 40% tinham a bolsa rota, enquanto 60% apresentavam a mesma com integridade. Este achado, portanto, não foi significativo.

Relatos de literatura sugerem uma íntima associação entre o HPV e o carcinoma do colo uterino (DÔRES, 1994). Em nossa amostra, verificamos a presença de 7 exames citológicos alterados dentre as 13 mulheres com DNA HPV positivo, donde 3 casos correspondiam a CIN II e, quando biopsiados, tiveram CIN III como resultado. Dos 4 casos correspondentes a CIN I na citologia, 2 deles tiveram o seu resultado confirmado pela histopatologia, enquanto os outros 2 apresentaram o equivalente a CIN II na biópsia.

Autores publicaram vários trabalhos sobre o número de falsos-negativos na citologia oncótica (COPPLESON, 1974) e (KOSS, 1989). Em nosso grupo, observamos 6 pacientes com citologias negativas que foram biopsiadas devido a alterações na colposcopia. Verificamos 2 casos de neoplasia intra-epitelial cervical, grau I e grau II respectivamente.

O uso da colposcopia como método diagnóstico das CIN provou ser altamente sensível (ZANINI-KOSLINSKI, 1992). Em nossa amostra, num total de 13 pacientes, 100% delas apresentaram exame colposcópico com alterações e, quando biopsiadas, 70% tiveram a presença de CIN na histopatologia.

Existem inúmeros relatos associando os vários tipos de HPV com lesões condilomatosas benignas e malignas (MALDONADO, 1994). Em 1985, zur HAUSEN, analisando vários casos de lesões pré-neoplásicas do colo uterino,

verificou que as alterações menos graves estavam associadas ao tipos de HPV 6/11, enquanto as lesões mais graves denunciavam a presença dos HPV 16/18. Corroboramos este fato em nosso estudo, onde verificamos que, dentre 13 pacientes DNA HPV positivas, 54% tinham suas lesões associadas ao HPV 16 e que o mesmo fazia-se presente em 100% dos casos de CIN III, enquanto os HPV 6 e 11 estavam presentes nas lesões com menor grau de atipia.

Em nosso grupo de estudo, ficou patente a importância da avaliação criteriosa das pacientes portadoras de lesões condilomatosas virais, devido serem as mesmas mais propensas a apresentarem alterações nos achados citológicos e histopatológicos.

Apesar de nossa amostra ser pequena, não nos foi possível caracterizar a presença do HPV nos colos uterinos fetais, mas vislumbramos uma nova linha de pesquisa, utilizando-se uma amostra maior e também fazendo análise através da PCR do líquido amniótico e placenta.

5 CONCLUSÕES

Após a exposição dos dados conclui-se que:

- a) não foi constatada a presença do DNA HPV nas células cervicais de fetos e natimorto de mulheres que comprovadamente tinham seqüências virais em suas células cérvico-vaginais, sugerindo desta maneira ausência de transmissão intra-útero;
- b) não foi demonstrada alteração nos estudos de histopatologia dos cérvices uterinos fetais e ou natimorto de pacientes que comprovadamente tinham a presença do DNA HPV em suas células oriundas do colo e paredes vaginais;
- c) o tipo do papiloma vírus humano mais freqüentemente encontrado nas lesões de alto grau foi o HPV 16, enquanto o HPV 11 foi mais freqüente nas lesões cervicais de baixo grau.
- d) o perfil da mulher DNA HPV positiva vem de encontro com aquela mulher pertencente ao grupo etário mais jovem, com início precoce de vida sexual e promíscua.

Em razão da amostra estudada em ambos os grupos ser pequena, aconselha-se a continuidade desse trabalho para verificar se as conclusões acima terão ou não confirmação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALEXIU, M; HERRNBERGER, K. Untersuchungen des Vaginalinhaltes bei Neugeborenen und Sauglingen. **Zbl. Gynak**, Berlin, v. 62, p.9, 1938.
- 2 ALMEIDA FILHO, G. Epidemiologia da infecção viral. In: JACYNTHO, C. et alii. **HPV infecção genital feminina e masculina**. Rio de Janeiro : Revinter, 1994.
- 3 ALMEIDA, J. D.; HOWATSON, A. F.; WILLIAMS, M. G. Electron microscope study of human warts: sites of virus production and nature of the inclusion bodies. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v.38, p.337-345, jun.1962.
- 4 ALVES, O.; BITHETTI, S.; BARUFFI, I. Aspectos epidemiológicos do câncer do colo uterino. **J. Bras. Ginecol.**, v. 94, p. 397, 1984.
- 5 AMUNDARAIN, J. **Investigaciones anatomofisiológicas sobre el cuello uterino fetal**. Tese Doutorado. Valencia, p. 47, 1962.
- 6 ANDROPHY, E. J; SCHILLER, J. T.; LAWICY, D. R. Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. **Science**, v.230, n.25, p.442-445, oct.1985.
- 7 ANGEVINE, D. M.; NORBACH, D. H.; DORTZBACH, R. K. Virus in papilloma. **JAMA**, Chicago, v.246, n.10, p.1087-1088, set.1981.
- 8 AYRE, E. **Cancer cytology of the uterus**. New York, Grune e Stratton, 1951.
- 9 AYRE, J. E. The vaginal smear: Precancer cell using a modified technique. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.58, n.3, p.1205, 1949.

- 10 BACHMAN, C.; COLLIP, J. B. & Selye, H. Effects of prolonged estriol administration upon the sex skin of *Macaca mulatta*. **Proc. Roy. Soc.**, London, v.117, p.16, 1935.
- 11 BAFVERSTEDT, B. Condylomata acuminata-past and present. **Acta Derm. Venereol.**, v.47, p.376, 1967.
- 12 BAIN, R. W; CRACKER, D. W. Rapid onset of cervical cancer in an upper socioeconomic group. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 146, n. 4, p. 366-371, jun. 1983.
- 13 BARRERA-ORA, J. G; SMITH, K. O.; MELNICK, J. L. Quantitation of papovavirus particles in human warts. **J.N.C.I.**, Bethesda, v.29, p.583-595, sep.1962.
- 14 BARRET, T. J.; SILBAR, J. D.; MCGINLEY, J. P. Genital warts-a venereal disease. **JAMA**, v.154, p.333, 1954.
- 15 BARUAH, M. C.; LAL, S.; SELVARAJU, M.; VELIATH, A. J. Perianal condylomata in a male child. **Br. J. Vener. Dis.**, London, v.60, p.60, 1984.
- 16 BECK, H & ZIMMERER, G. Zur Frage der Sexualhormonwirkung auf die Vaginalschleimhaut beiruhender Ovarialtatigkeit. **Zbt. Gynak.**, Berlin, v.78, p.161, 1956.
- 17 BERMAN, A.; WIKELMAN, R. K. Flat warts undergoing involution: Histopathologic findings. **Arch. Dermatol.**, v.113, n.9, p.1219-1221, sep.1977.
- 18 BIBBO, M.; WIED, G. Inflammatory reactions, tissue repair and microbiologic classification of female genital tract. **Tutorials of Cytology Office**, Chicago, 1973.
- 19 BISHOP, J. M. Cellular oncogenes and retroviruses. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 52, p. 301-354, 1983.

- 20 BONILLA, F; GARCIA SERRANO, A. La evolución morfológica del útero fetal. **Arch. Esp. Morfol.**, v.15, p.127, 1959.
- 21 _____. Investigaciones sobre la morfología del cérvix del útero fetal. **Toko-Ginec.Pract.**, v.20, p.333, 1961.
- 22 _____. Los factores anatómicos de la interrupción habitual de la gravidez. **Rev. Esp. Obst. Ginec.**, v.20, p.475, 1963.
- 23 BOSHART, M; zur HAUSEN, H. Human papillomaviruses in Buschke-Lowenstein tumours: Physical state of the DNA and identification of a tandem duplication in the noncoding region of a human papillomavirus type 6 subtype. **J. Virol.**, New York, v. 58, n. 3, p. 963-968, jun. 1986.
- 24 BURGER, M. P. M.; HOLLEMA, A. S.; GOUW, A. S. H. et al. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. **B.M.J.**, v. 306, p. 749, mar.1993.
- 25 CARMICHAEL, J. A.; MOHER, D. Cervical carcinoma in women aged 4 and yonger. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.154, n.2, p. 264, feb.1986.
- 26 CASAS-CORDERO, M.; MORIN, C.; ROY, M.; et al . Origin of the koilocyte in condylomata of the human cervix:ultrastructural study. **Acta Citol.**, v.25, p.388-391, 1981.
- 27 CIUFFO, G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. **G. Ital. Mal. Venereol.** v.48, p.12, 1907.
- 28 COPPLESON, L. W.; BARRY, B. Estimation of the scening error rate from the observed detection rates in repeated cervical cytology. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.119, n.7 , p 953, ago.1974.
- 29 COPPLESON, M. The new colposcopic terminology. **J. Reprod. Med.** v.16, p.214, 1976.

- 30 COUPEZ, F.; CARRERA, S. M.; DEXEUS, S. editors. **Traite et atlas de colposcopie**. Paris, Masson e Cie, 1974.
- 31 CRAWFORD, L. Papilloma viruses and cervical tumours. **Nature**, London, v.310, n.5, p.16, jul.1984.
- 32 CROISSANT, O; BREITBURD, F; ORTH, G. Specificity of cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. **Clin. Dermatol.**, New York, v.3, p.43, 1985.
- 33 CRUM, C. P.; MITAO, M; LEVINE, R. V.; SILVERSTEIN, S. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. **J. Virol.**, Washington, v. 54, n. 3, p. 675-681, jun. 1985.
- 34 DANOS, O. Papillomavirus progrès récents. **Sem. Hôp.**, Paris, v.63, p.68, 1987.
- 35 DEGIROLAMI, E. Perinuclear halo versus koilocytotic atypia. **Obstet. Gynecol.**, v. 29, n. 2, p. 479, 1967.
- 36 DELLA TORRE, G.; PILOTTI, S; DI PAOLO, G.; RILKE, F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. **Tumori**, Milano, v.64, n.5, p.549, oct.1978.
- 37 _____; PILOTTI, S; RILKE, F; DI PAOLO, G. Human papilloma virus in cervical flat condylomata. **International Symposium on Combined Modalities Approach on Gynecologic Cancer**. (May 19-20, 1983, Mexico D. F.) Abstr. p.106.
- 38 DEVILLIERS, E. M. Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. **Genitourin. Med.** v. 68, p. 50, 1992.
- 39 DÔRES, G. B. HPV na genitália feminina. **Manual e guia prático de cirurgia de alta freqüência**. São Paulo : Multigraf Editora Ltda, 1994

- 40 DUNN, A. E.; OLGIVIE, M. M. Intranuclear virus particles in human genital warts tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. **J. Ultrastruct. Res.**, New York, v.22, p.282, 1968.
- 41 DUNN, J. E.; SCHWEITZER, V. The relationship of cervical cytology to the incidence of invasive cervical cancer and mortality in Alameda County, California, 1960 to 1974. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 139, n. 8, p. 868-876, apr. 1981.
- 42 _____; CRACKER, D. W; RUBE, I. F; ERICKSON, C. L; COLEMAN, S. A. Cervical cancer occurrence in Memphis and Shelby County, Tennessee, during 25 years of its cervical cytology screening program. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 150, n. 7, p. 861-864, dec. 1984.
- 43 DURST, M; KLEINHEINZ, A; HOLZ, M; GISSMAN, L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. **J. Gen. Virol.**, London, v. 66 (pt 7), p. 1515-1522, jul. 1985.
- 44 _____; CROCE, C; GISSMAN, L; SCHWARZ, E; HUEBNER, K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical cancers. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 84, n. 4, p. 1070-1074, feb. 1987.
- 45 EVANS, C. A.; WEISER, R. S.; ITO, Y. Antiviral and antitumor immunological mechanisms operative in the Shope papilloma carcinoma system. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** Harbor, NY, v. 27, p. 453-462, 1962.
- 46 _____; ITO, Y. Antitumor immunity in the Shope papilloma-carcinoma complex III Response to reinfection with viral nucleic acid. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda MD, v. 36, p. 1161-1166, jun. 1966.

- 47 FEARON, E. R.; JONES, P. A. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. **FASEB. J.** v.5, n. 2, p. 2783, 1992.
- 48 FERENCZY, A; MITAO, M; NAGAI, N; SILVERSTEIN, S. J; CRUM, C. P. Latent papillomavirus and recurring genital warts. **N. Eng. J. Med.**, v.313, n.13, p.784-788, sep.1985.
- 49 FERNANDEZ-Cid, A.; Dexeus, S. :Reparación tissular en citología vaginal exfoliativa. **Acta Ginecol.**, v.29, p.379, 1976.
- 50 FIGGE, D. C; BENNINGTON, J. L; SCHWEID, A. I. Cervical cancer after initial negative and typical vaginal cytology. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 108, p. 422-428, oct. 1970.
- 51 FLUHMANN, C. F. The cervix uteri and its diseases. **Sauders.** Philadelphia, p. 56, 1961.
- 52 FRAENKEL, L & PAPANICOLAOU, S. N. Growth, desquamation and involution of the vaginal epithelium of human fetuses and children, with consideration of the related hormonal factors. **Am. J. Anat.** v.62, p.427, 1938.
- 53 FRANCESCHI, S.; DOLL, R.; GALLWEY, J.; et al. Genital warts and cervical neoplasia:an epidemiological study. **Br. J. Cancer**, London, v.48, n.5, p.621-628, nov.1983.
- 54 FU, I. S.; REAGAN, J. W.; RICHART, R. M. Precursors of cervical cancer. **Cancer Surveys**, v.2, p.359, 1983.
- 55 FUGIMOTO, I.; NEMOTO, H.; FUKUDA, K. et al. Epidemiologic study of carcinoma in situ of the cervix. **J. Reprod. Med.**, Chicago, v. 30, n. 7, p. 535, July, 1985.
- 56 FURGGIK, S; GRUBB, R; KULLANDER, S; SANDAHL, B; WINEGERUP, L; EYDAL, A. Familial ocurrence of cervical cancer,

- stages 0-IV. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 65, n. 3, p. 223-227, 1986.
- 57 GAL, A. A.; MEYER, P. R.; TAYLOR, C. R. Papillomavirus antigens in anorectal condyloma and carcinoma in homosexual men. **J. Am. Med. Assoc.**, New York, v. 257, n. 3. p. 337-340, jan. 1987.
- 58 GHIARDINI, C.; GHINOSI, P.; RAISI, O.; et alii. Human papillomavirus DNA detection in Papanicolaou-stained cervical smears with a nonradioactive, in situ hybridization assay. **Acta Cytol.**, v. 36, n. 2, p. 185, mar. 1992.
- 59 GISSMAN, L; SCHWARTZ, E. Persistence and expression of human papillomavirus DNA in genital cancer. In: EVERED, D; CLARK, C. (eds). **Papillomaviruses**. Manchester, John Wiley, 1986, p. 190-197.
- 60 GROFF, D. E.; SUNDEBERG, J. P.; LANCASTER, W. D. Extracromossomal deer fibromavirus DNA in deer fibromas virus-transformed mouse cells. **Virology**, New York, v. 131, n. 2, p. 546-550, 1983.
- 61 GROSS, G. Lesions of the male and female external genitalia associated with human papillomaviruses. In: SYRJANEN, K. J.; GISSMANN, L; KOSS, L. (eds). **Papillomaviruses and human diseases**. Heidelberg, Springer-Verlag, 1987.
- 62 HOUWELING, A.; VAN DER ELSEN, P. J.; VAN DER ERB, A. J. Partial transformation of primary rat cells by the left-most 45% fragment of adenovirus 5 DNA. **Virology**, New York, v. 105, n. 2, p. 537-50, sep. 1980.
- 63 IWATSUKI, K; TAGAMI, H; TAKIGAWA, M; YAMADA, M. Plane warts under spontaneous regression: Immunopathologic study of cellular constituents leading to the inflammatory reaction. **Arch. Dermatol.**, v. 122, n. 6, p. 655-659, jun. 1986.

- 64 JABLONSKA, S.; ORTH, G.; LUTZNER, M. A. Immunopathology of papillomavirus-induced tumours in different tissues. **Springer Semin. Immunopathol.**, Berlin, v.5, n.1, p.33-53, 1982.
- 65 JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G.; MALDONADO, P. **HPV Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro : Revinter, 1994.
- 66 KADISH, A. S.; BURK, R. D.; KRESS, Y; CALDERIN, S; ROMNEY, S. L. Human papillomaviruses of different types in precancerous lesions of the uterine cervix: histologic, immunocytochemical and ultrastructural studies. **Human Pathol.**, Philadelphia, v.17, p.384-392, apr.1986.
- 67 KASHIMA, H.; SHAH, K. Recurrent respiratory papillomatosis. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.14, n.2, p.581, 1987.
- 68 KISTNER, R. W.; HERTIG, A. T. Papillomas of the uterine cervix: Their malignant potentiality. **Obst. Gynecol.**, v.6, p.147, 1955.
- 69 KOSS, L. The Papanicolaou test for cervical cancer detection: A triumph and a tragedy. **JAMA**, v. 261, n. 5, p. 736, feb.1989.
- 70 KREIDER, J. W.; HOWETT, M. K.; WOLFE, S. A.; BARTLETT, G. V.; ZAINO, R. J.; SEDLACEK, T. V.; MARTEL, R. Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. **Nature**, London, v.317, p.639-641, oct.1985.
- 71 KURMAN, R. J.; JENSON, A. B.; LANCASTER, W. D. Papillomavirus infection of the cervix. II Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.7, n.1, p.39-52, jan.1983.
- 72 LA PORTE, R. F.; TAICHMAN, L. Human papillomaviral DNA replicates as a stable episome in cultured epidermal keratinocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.79, n.3, p.393, 1982.

- 73 LACK, E. E.; JENSON, A. B.; SMITH, H. G.; HEALY, G. B.; PASS, F.; VAWTER, G. F. Immunoperoxidase localization of human papillomavirus in laryngeal papillomas. **Interviral**, v.14, n.3-4, p.148-154, 1980.
- 74 LANCASTER, W. D.; MEINKE, W. Persistence of viral DNA in human cell cultures infected with human papillomavirus. **Nature**, London, v.256, p.434-436, jul.1975.
- 75 _____. Apparent lack of integration of bovine papillomavirus DNA in virus- induced equine and bovine tumor cells and virus-transformed mouse cells. **Virology**, New York, v. 108, n. 2, p. 251-255, jan. 1981.
- 76 LAURENT, R; AYACHE, P; COUME-MARQUET, J. Ultrastructure of clear cells in human viral warts. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v.2, p.140, 1975.
- 77 LEE, W. M. f.; SCHWAB, M.; WESTAWAY, D; VARMUS, H. Augmented expression of normal c-myc is sufficient for ca transformation of rat embryo cells with a mutant ras gene. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 5. n. 12, p. 3345-3356, dec. 1985.
- 78 LORINCZ, A. T.; TEMPLE, G. F.; PATTERSON, J. A.; JENSON, A. B.; KURMAN, R. J.; LANCASTER, W. D. Correlation of cellular atypia and human papillomavirus DNA sequences. in exfoliated cells of the uterine cervix. **Obstet. Gynecol**, v.68, p.508-512, oct.1986.
- 79 LUTZNER, M. A. Epidermodysplasia verruciformis. **Bull. Cancer**, Paris, v. 65, n. 2, p. 169-82, 1978.
- 80 LUTZNER, M; CROISSANT, O; DUCASSE, M. F; KREIS, H; CROSNIER, J; ORTH, G. A potentially oncogenic human papillomaviruses (HPV5 found in two renal allograft recipients. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 75, n. 4, p. 353-6, oct. 1980.

- 81 MALDONADO, P. Métodos de detecção do HPV. In: JACYNTHO, C.; et alii. **HPV infecção genital feminina e masculina**. Rio de Janeiro : Revinter, 1994.
- 82 MC VAY, P.; FRETZ, M.; WETTSTEIN, F; STEVENS, J; ITO, Y. Integrated Shope virus DNA is present and transcribed in the transplantable rabbit tumor vx-7. **J. Gen. Virol.**, London, v. 60, (pt 2), p. 271-278, jun. 1982.
- 83 MCCANCE, D. J. & SIGER, A. The importance of HPV infection in the male and female genital tract and their relationship to cervical neoplasia. **Banbury Report 21: Viral etiology of cervical cancer**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- 84 MEAKER, C. **Human Sterility**. London, Ballière, Tindall Co., 1934.
- 85 MEISELS, A.; FORTIN, F. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I: Cytologic Patterns. **Acta Cytol.**, Baltimore, v. 20, n. 6, p. 505-509, nov./dec. 1976.
- 86 _____; ROY, M; FOSTIER, M; MORIN, C; CASAS-CORDERO, M; SHAH, K. V; TURGEON, H. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 25, n. 1, p. 7-16, jan./feb. 1981.
- 87 _____; MORIN, C. Flat condyloma of the cervix: two variants with different prognosis. In: PETO, R; zur HAUSEN, H. (eds). **Viral etiology of cervical cancer**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 115-120, 1986.
- 88 MONTALVO, L.; SLOCKER, C. Biologia vaginal infantil. **Arch. Med. Exper.**, v.5, p.249, 1952.
- 89 NAIB, Z. M. **Exfoliative cytopathology**. 3^a ed. Boston, Little Brown, 1983.

- 90 ORIEL, J. D.; ALMEIDA, J. D. Demonstration of virus particles in human genital warts. **Br. J. Vener. Dis.**, London, v.46, n.1, p.37-42, feb.1970.
- 91 _____. Natural history of genital warts. **Br. J. Vener. Dis.**, v. 47, p. 1, feb.1971.
- 92 ORIEL, J. D. Epidemiology of human papillomavirus. In: DI PAOLO, G.; RILKE F, zur HAUSEN, H.(eds). **Herpes and Papillomaviruses**. New York, Sero Symposia Publication from Raven Press, 1986, vol.31, p. 55.
- 93 ORTH, J.; FAVRE, M.; BREITBURD, F.; CROISSANT, O.; JABLONSKA, S.; OBALEK, S.; JARZABEK-CHORZELSKA, M.; RZESA, G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for the role of papillomaviruses in human cancer. In: ESSEX, M.; TODARO, G.; zur HAUSEN, H. (eds). **Viruses in naturally occurring cancers**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p.259-264.
- 94 PAPANICOLAOU, G.N.; TRAUT, H.F. **Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear**. New York : The Commonwealth Fund, 1943.
- 95 PATSNER, B.; MANN, W. J.; LOCHE, M. Should routine endocervical curettage be performed on patients with human papillomavirus infections of the cervix and adequate colposcopy? **Colpos. Gyn. Las. Surg.** v. 3, p. 191, 1987.
- 96 _____. BAKER, D. A.; ORR, J. W. Human papillomavirus genital tract infections during pregnancy. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 33, n. 2, p.258, jun. 1990
- 97 PFISTER, H. Papillomavirus: general description, taxonomy, and classification. In: SALZMAN, N. D.; HOWLEY, P. M.(eds). **The papovaviridae**. Vol. 2, New York, Plenum Press, 1987, p.1.

- 98 _____; zur HAUSEN, H. Seroepidemiological studies of human papillomavirus (HPV-1) infections. **Int. J. Cancer**, New York, v.21, n.2, p.161-165, feb.1978.
- 99 POPESCU, N. S; AMSBAUGH, S. C.; DI PAOLO, G. Human papillomavirus type 18DNA is integrated at a single chromossome site in cervical carcinoma cell line SW756. **J. Virol.**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1682-1685, may, 1987.
- 100 POWELL, L. C.; POLLARD, M. JINKINS, J. C. Treatment of condylomata acuminata by autogenous vaccine. **South Med. J.** Birmingham, Al, v. 63, p. 202-205, feb. 1970.
- 101 PRAETORIUS-CLAUSEN, F. Histopathology of focal epithelial hyperplasia. Evidence of viral infection. **Taendlaegebladet**, v.73, p.1013, 1969.
- 102 PUCK, A.; HUBNER, K. A. Die Wirkungen des Oestriols auf Uterus und Vagina des Kaninchens und Meerschweinchens und auf die Symphyse des Meerschweinchens. **Acta Endocr.**, v.22, p.191, 1956.
- 103 PUROLA, E.; SAVIA, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. **Acta Cytol.**, v.21, p.26-31, jan./feb.1977.
- 104 RANDO, R. F.; Groff, D. E; CHIRKJIAN, J. G.; LANCASTER, W. D. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6DNA from an invasive vulvar carcinoma. **J. Virol.**, Washington, v. 57, n. 1, p. 353-356, jan. 1986.
- 105 _____; SEDLACEK, T. V.; HUNT, J.; JENSON, A. B.; KURMAN, R. J.; LANCASTER, W. D. Verrucous carcinoma of the vulva associated with an unusual type 6 human papillomavirus. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 67, suppl. 3, p. 705-755, mar, 1986.

- 106 REID, R.; HERCHMAN, B. R.; CRUM, C. P. Genital warts and cervical cancer. V. The tissue basis of colposcopic change. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.149, p.293-303, 1984.
- 107 _____; SCALZI, P. Genital warts and cervical cancer. VII. An improved colposcopic index for differentiating benign papillomaviral infections from high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.153, p.611-618, 1985.
- 108 RICHART, R. M.; BARRON, B. A. A follow-up study of patients with cervical neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 105, n. 1, p. 386, Oct. 1969.
- 109 RIOU, G. F.; BARROIS, M; DUTRANQUAY, V; ORTH, G. Presence of papillomavirus DNA sequences amplification of c-myc and c-Ha-ras oncogenes and enhanced expression of c-myc in carcinomas of the uterine cervix. In: HOWLEY, P. M; BRAKES, T. R. (eds). **Papillomaviruses: Molecular and Clinical aspects**. New York, Alan, R. Liss, 1985, p.47-56.
- 110 ROMAN, A.; FIFE, K. Human papillomavirus DNA associated with foreskins of normal newborns. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.153, n.5, p.855-861, may 1986.
- 111 ROUS, P; FRIEDEWOLD, W. F. The effect of chemical carcinogens on virus -induced rabbit papillomas. **J. Exp. Med.**, v.79, p.511, 1944.
- 112 SCHILLER, J. Metabolic changes in rat organs induced by estrogens. **Endocrinology**, v.15, p.367, 1945.
- 113 SCHNEIDER, A.; HOLTZ, M.; GISSMAN, L. Increased prevalence of human papilloma viruses in the lower genital tract of pregnant women. **Int. J. Cancer**, New York, v.40, p.198, 1987.

- 114 SEDLACEK, T. V.; LINDHEIM, S.; EDER, C. Mechanism of human papillomavirus transmission at birth. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.161, n.1, p.55-59, jul.1989.
- 115 SHOPE, R. Infectious papillomatosis of rabbits. **J. Exp. Med.**, v.58, p.609, 1933.
- 116 SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo, McGraw-Hill, 1975.
- 117 SILVERBERG, E; LUBERA, J. Cancer statistics, 1986. **Cancer**, v. 36, n. 1, p. 9-25, jan. /feb. 1986.
- 118 SKOLOW, J. Is the human placenta permeable to gonadotropic and estrogenic hormones? **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.49, p.607, 1942.
- 119 SMITH, E. M.; JOHNSON, S. R. CRIPE, T. P.; et al: Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent development of respiratory tract papillomatosis. **Ann. Otol. Rinol. Larigol.** v. 100, n. 3, p. 479-483, 1991.
- 120 SMOLKA, H; KOSCH, L. Ueber zytologische Veränderungen am Vaginalepithel des Neugeborenen. **Geb. Frauenhk.**, v.14. p.337, 1954.
- 121 SMOTKIN, D.; WETTSTEIN, F. O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, n.13, p.4.680-4684, jul.1986.
- 122 SONG, J. **The human uterus: Morphogenesis and embryological basis for cancer**. Springfield, Ch. Thomas, 1964.

- 123 SOUSA, R; DOSTATINI, N; YANIV, M. Control of papillomavirus gene expression. **Biochemica Biophysica Acta**, Paris, v.1, n.19, p.1032, jun.1990.
- 124 SPIEGEL, M. **Estatística e probabilidade**. São Paulo, McGraw-Hill, 1976.
- 125 STRAUSS, M. J.; SHAW, E. W.; BUNTING, H; MELNICK, J. L.
"Crystalline"virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusions bodies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Baltimore, v.72, p.46-50, oct.1949.
- 126 SYRJANEN, K.; VAYRYNEN, M.; HIPPELAINEN, M.; CASTREN, O.; SAARIKASKI, S.; MANTYJARVI, R. Electron microscopic assestment of cervical punch biopsies in women followed-up for human papillomavirus HPV lesions. **Arch. Geschwulstforsch**, Dresden, v.55, n.2, p.131-138, 1985.
- 127 TAGAMI, H; OKU, T; IWATSUKI, K. Primary tissue culture of spontaneously regressing flat warts: In vitro attack by mononuclear cells against wart-derived epidermal cells. **Cancer**, v.55, n.10, p.2437-2441, may 1985.
- 128 TANG, C. K.; SHEMETA, D. W.; WOOD, C. Congenital condylomata acuminata. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.131, n.8, p.1912-1913, aug.1978.
- 129 TSENG, C. J.; LIN, C. Y.; WANG, R. L.; et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 166, n. 1, p. 35-40, 1992.

- 130 WAGNER, D.; IKENBERG, H.; BOEHN, N.; et alii. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by DNA in situ hybridization. **Obstet. Gynecol.** v.64, n.3, p.767, 1984.
- 131 WETTSTEIN, F. O.; STEVENS, J. G. Variable-sized free episomes of Shope papilloma virus DNA are present in cell non-virus-producing neoplasms and integrated episomes are detected in some. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 79, n. 3, p. 790-794, feb. 1982.
- 132 WITSCHI, E. Development and differentiation of the uterus. In: **Prenatal**. Detroit, Life Ack., 1970.
- 133 WRIGHT, D.K.; MANOS, M.M. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. (eds). **PCR protocols: A guide to methods and applications**. Orlando, FL. Academic, 1990.
- 134 ZANINI-KOSLINSKI, R. M. **Os fatores epidemiológicos das eoplasias intra-epiteliais cervicais. A importância da infecção pelo papiloma vírus humano.** Uma correlação colposcópica, colpocitológica e histopatológica. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, p. 34, 1992.
- 135 ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, R. C. M H C-restricted cytotoxic T cells: Studies of the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction-specificity, function and responsiveness. **Adv. Immunol. and Cancer Therapy**, New York, v. 25, n. 27, p. 51-177, 1979.
- 136 zur HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v.36, p.530, 1976.
- 137 _____. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v.78, p.1, jan.1977.

138 _____. Genital papillomavirus infection. **Prog. Med. Virol.**, v. 32, n. 1, p.
15, 1985.

-0-