

DIANA ELICI SADER ENGELMAN

**CARCINOMA "IN SITU" E CARCINOMA ESCAMOSO
ESTÁDIO IA DA VULVA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O
VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO. ESTUDO PELAS
TÉCNICAS DE IMUNOPEROXIDASE E HIBRIDIZAÇÃO
"IN SITU"**

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.
Área de concentração: Anatomia Patológica

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE

Campinas
1994

UNIDADE	6C
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	En32c
V.	Ex.
TEMPO	60/22808
PROC.	286/94
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$11,00
DATA	21/10/94
N.º CPD	

CM-00063167-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Engelman, Diana Elici Sader
En32c
Carcinoma "in situ" e carcinoma escamoso estadio Ia da vulva, e sua associação com o vírus do papiloma humano. Estudo pelas técnicas de imunoperoxidase e hibridização "in situ" / Diana Elici Sader Engelman. -- Campinas, SP : [s.n.], 1994.
Orientador: Líliliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade. Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
1. Carcinoma in situ. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Vulva. 4. Vírus do papiloma 5. Hibridização de ácido nucleico. 6. Técnicas imunoenzimáticas. I. Andrade, Líliliana Aparecida Lucci De Angelo. II. Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências médicas. III. Título
20. CDD -616.994 -618.16 -616.091 4 -574.873 28 -616.079

Índices para catálogo sistemático:

1. Carcinoma in situ 616.994
2. Carcinoma de células escamosas 616.994
3. Vulva 618.16
4. Vírus do papiloma 616.091 4
5. Hibridização do ácido nucleico 574.873 28
6. Técnicas imunoenzimáticas 616.079

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Luiz, exemplo de integridade e humanidade, em cujos atos procurarei me espelhar durante toda a vida.

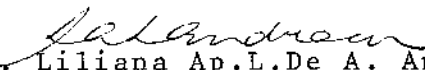
À minha mãe, Robyn, pela presença e auxílio nos cuidados com os meus filhos durante minhas ausências.

Ao meu marido, Inácio, pelo seu amor, compreensão e estímulo durante a realização deste trabalho.

Aos meus filhos, Luiz Henrique e Érica, perdão pela minha ausência nesta fase de suas vidas.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Mestrado apresentado a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Área de Anatomia Patológica da aluna Diana Elici Sader Engelman.

Campinas, 18 de agosto de 1994


Prof. Dra. Lillian Ap. L. De A. Andrade
Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra. Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade pela amizade, estímulo e paciência durante a elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. José Vassalo pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À Prof^ª. Dra. Luisa Lina Villa, Chefe do Grupo de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, filial de São Paulo, pela orientação na primeira elaboração da técnica de hibridização do DNA.

Às biólogas Glauce Aparecida Pinto e Silvia Pierre Irazusta, que realizaram as técnicas de imuno-histoquímica e hibridização do DNA.

Às técnicas Lea de Magalhães Simões e Luzia Aparecida M. Ribeiro Reis, pela preparação do material para o estudo imuno-histoquímico e de hibridização.

Aos técnicos Marcella Pinheiro e Marcos Damião da Silva do Instituto Ludwig de São Paulo, pelo auxílio na realização da técnica de hibridização.

À secretária Maria Aparecida Francisco pelo trabalho de datilografia deste trabalho.

Às amigas Aurea Tieko Kikuchi Ueno e Ana Lúcia Brunelli pela presença e estímulo durante a realização deste estudo.

À colega Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, pelo incentivo e auxílio durante a elaboração final da tese.

Ao Dr. Inácio Engelman pelo auxílio na revisão do texto.

À Fernanda Atibaia pela simpatia, atenção e auxílio na digitação final do trabalho.

ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANÁLISE DA LITERATURA	5
3.1. Neoplasia intraepitelial vulvar	5
3.1.1. Aspectos clínicos	7
3.1.2. Aspectos macroscópicos	7
3.1.3. Aspectos histológicos	8
3.1.4. Evolução e tratamento	11
3.2. Papulose bowenóide	13
3.3. Carcinoma escamoso da vulva, estágio Ia	15
3.4. Estudos sobre a patogênese	20
3.4.1. Estudos epidemiológicos	21
3.4.2. Vírus do herpes simples	22
3.4.3. Vírus do papiloma humano	24
3.5. Métodos de investigação do vírus do papiloma humano	47
3.5.1. Microscopia óptica	48
3.5.2. Microscopia eletrônica	51
3.5.3. Imuno-histoquímica	53
3.5.4. Hibridização do DNA	55
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	63
4.1. Seleção das amostras	63
4.2. Immunoperoxidase	64
4.3. Hibridização "in situ"	69
4.4. Análise estatística	73

5. RESULTADOS	75
5.1. Pacientes e exames anatomopatológicos	75
5.2. Informações clínicas e dados do exame físico e macroscópico	76
5.3. Diagnósticos histológicos	77
5.4. Distribuição etária	86
5.5. Lesões associadas no trato genital feminino inferior	88
5.6. Imunoperoxidase	90
5.7. Hibridização "in situ"	95
5.8. Relação entre as técnicas de imunoperoxidase e hibridização "in situ" Correlação dos dados morfológicos e as técnicas de detecção do vírus....	102
6. DISCUSSÃO	108
6.1. Informações clínicas e dados do exame físico e macroscópico.....	108
6.1.1. Exame físico	108
6.1.2. Localização das lesões	108
6.1.3. Multiplicidade de lesões	109
6.2. Diagnóstico histológico	110
6.2.1. Variante histológica	110
6.2.2. Extensão para apêndices cutâneos	111
6.2.3. Sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo vírus do papilo- ma humano	111
6.3. Carcinoma superficialmente invasivo da vulva estágio Ia	114
6.4. Distribuição etária	115
6.5. Lesões associadas no trato genital feminino inferior	118
6.6. Imunoperoxidase	120
6.7. Hibridização "in situ"	125
6.8. Análise conjunta das duas técnicas	130
6.9. O valor da tipagem do HPV	132
7. CONCLUSÕES	134
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

ANEXO

RESUMO

RESUMO

Recentemente tem sido observado um aumento da frequência de diagnósticos de neoplasia intraepitelial vulvar grau III, principalmente em mulheres jovens. Estudos sobre o câncer genital apontam evidências de que a infecção pelo vírus do papiloma humano é um fator de risco importante para a transformação neoplásica epitelial. No período de 1983 a 1992 foram levantados 30 casos de neoplasia intraepitelial vulvar grau III e seis de carcinoma escamoso estágio Ia. A pesquisa do antígeno comum do capsídeo viral foi realizada através da imunoperoxidase. O estudo do tipo do vírus nas lesões foi realizada pela técnica de hibridização "in situ", com utilização de sondas biotiniladas dos HPV 6/11, 16/18 e 31/35/51. A idade média das pacientes com neoplasia intraepitelial vulvar foi de 47,5 anos e das com carcinoma estágio Ia, 61,1 anos. Histologicamente foram observadas atipias coilocitóticas em 83,3% dos casos. O exame da imunoperoxidase foi positivo em 36,1% dos casos, com idade média de 39,1 anos. A detecção do vírus pela hibridização "in situ" ocorreu em 41,7% dos casos, com idade média de 38,3 anos. Todos os casos positivos apresentaram o tipo 16/18, porém em quatro casos houve associação de diferentes tipos virais na mesma lesão. A positividade dos métodos não estava associada à presença ou ausência de atipias coilocitóticas. Quando se considerou a positividade para um ou outro método, a detecção do vírus ocorreu em 63,9% dos casos. A alto índice de detecção relaciona o papilomavírus humano com estas lesões, em especial o tipo 16/18, principalmente em grupos etários mais jovens. A ampla faixa etária de

distribuição dos casos de neoplasia intraepitelial vulvar grau III, sugere que o seu tempo de evolução é longo, demonstrando a importância do exame da vulva no exame ginecológico de rotina para melhor detecção e tratamento precoce das lesões.

SUMMARY

SUMMARY

Recently, an increase has been observed in the frequency of diagnosis of vulvar intraepithelial neoplasia grade III, specially in young women. Studies in gynecologic cancer suggest that human papillomavirus infections play an important role in the epithelial neoplastic transformation. Between 1983 and 1992, 30 cases of vulvar intraepithelial neoplasia grade III and six cases of vulvar carcinoma stage Ia were analysed. The research for the common antigen of the viral capsid was done by the immunoperoxidase technique. The virus types were identified by the "in situ" hybridization technique, with biotinylated probes for HPV 6/11, 16/18 and 31/35/51. The mean age of the patients with vulvar intraepithelial neoplasia was 47,5 years and the ones with vulvar carcinoma stage Ia, 61,1 years. Histologically, koilocytotic atypia was observed in 83,3% of the cases. The immunoperoxidase technique was positive in 36,1% of the cases, with the mean age of 39,1 years. The detection of the virus by "in situ" hybridization occurred in 41,7% of the cases, with mean age of 38,3 years. All the positive cases had the virus type 16/18, but in four of them there was association with other virus types in the same lesion. The positivity of these techniques was not related to the presence or absence of koilocytotic atypia. When the positivity for one or the other method was considered, virus detection occurred in 63,9% of the cases. This high rate of detection shows a relationship of the human papillomavirus with these vulvar lesions, specially with type 16/18 and in younger age groups. The wide age range distribution of the vulvar intraepithelial neoplasia

grade III patients, suggests that its evolution is long, showing the importance of the vulvar region in routine gynecologic examination, to allow early detection and treatment of these lesions.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma da vulva é uma neoplasia pouco freqüente, representando cerca de 5% de todos os cânceres da mulher (SYRJÄNEN, GISSMANN, KOSS, 1987; FU & REAGAN, 1989). Atinge principalmente mulheres idosas, ao redor da sétima década (NOUMOFF & FARBER, 1986; HØRDING et al., 1991; WOODRUFF, 1991), e na grande maioria dos casos, histologicamente é do tipo epidermóide (SYRJÄNEN et al., 1987).

São também descritas na vulva lesões precursoras do carcinoma invasor, constituindo os epitélios atípicos ou displásicos em diferentes graus de intensidade, conhecidos atualmente por **neoplasia intraepitelial vulvar** (NIV, ou VIN do inglês) (WILKINSON, KNEALE, LYNCH, 1986). Ocorrem numa área ampliada do epitélio anogenital (FU & REAGAN, 1989), incluindo vagina, uretra, ânus e dobra interglútea, derivados de um órgão cloacal comum, e sujeito a vários agentes carcinogênicos, sendo habitual o desenvolvimento de lesões multifocais e multicêntricas (POWELL et al., 1986; BECKMANN et al., 1988; BUSCEMA et al., 1988; FU & REAGAN, 1989; REID & GREENBERG, 1991).

Nos últimos quinze anos (SYRJÄNEN, 1992), o grande interesse no estudo das lesões precursoras do câncer do colo uterino, correlacionando-as com agentes virais, principalmente o vírus do papiloma humano (HPV), ampliou a busca de lesões precursoras do câncer em todo o epitélio do trato genital feminino inferior.

Desta forma, tem sido observado um crescimento da freqüência do diagnóstico de carcinoma "in situ" da vulva (ou VIN III), com tendência a ocorrer

em grupos etários mais jovens (BUCKLEY, BUTLER, FOX, 1984; CRUM et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; BARBERO et al., 1990; HØRDING et al., 1991; WOODRUFF, 1991), sendo que aproximadamente 40% têm idade menor ou igual a 40 anos (BUCKLEY et al., 1984; CRUM et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; SHAFI et al., 1989). Este aumento pode ser real ou, muito provavelmente, resultante de um melhor conhecimento dessa entidade (BUCKLEY et al., 1984; POWELL et al., 1986; HUSSEINZADEH, NEWMAN, WESSELER, 1989), com uma melhor vigilância e acompanhamento das mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (CIN), com exames ginecológicos de controle mais freqüentes, e maior atenção do clínico preocupado em biopsiar qualquer tipo de epitélio alterado no trato genital inferior. Não há dúvida de que existe uma significativa associação entre as lesões intraepiteliais neoplásicas no trato genital, sugerindo um fator etiológico comum (POWELL et al., 1986; HØRDING et al., 1991).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos do trabalho

A partir da revisão da literatura sobre os conceitos de neoplasia intraepitelial vulvar e carcinoma escamoso estágio Ia da vulva (Ca. Ia.), seus aspectos clínicos e histopatológicos, sinonímia e fatores relacionados à patogênese, pretendemos:

1. rever e reclassificar os casos de neoplasia intraepitelial vulvar grau III e carcinoma escamoso da vulva estágio Ia, dos arquivos de patologia cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (DAP/FCM/UNICAMP), no período de 1983 a 1992.
2. verificar qual a distribuição das lesões em relação ao grupo etário.
3. avaliar nos casos estudados, a presença de alterações histológicas sugestivas de infecção pelo papilomavírus humano.
4. detectar, através de coloração imuno-histoquímica, pelo método da imunoperoxidase, a frequência da positividade do antígeno comum do capsídeo do papilomavírus humano associado às lesões de neoplasia intraepitelial vulvar grau III e carcinoma escamoso vulvar estágio Ia.

5. estudar, através do método da hibridização "in situ" do DNA (ácido desoxiribonucleico), quais os tipos de papilomavírus humano presentes nas lesões.
6. comparar os resultados da população estudada, com os dados da literatura.

ANÁLISE DA LITERATURA

3. ANÁLISE DA LITERATURA

3.1. Neoplasia intraepitelial vulvar

As neoplasias intraepiteliais são um desafio pelo aumento da incidência, sua relação incerta com o desenvolvimento do carcinoma invasor e controvérsias na etiologia e no tratamento destas lesões.

As lesões precursoras escamosas da vulva englobam várias entidades histológicas com termos diferentes para designá-las (FU & REAGAN, 1989), como: doença de Bowen, papulose bowenóide, eritroplasia de Queyrat, carcinoma simples, hiperplasia atípica, displasia, atipias vulvares e carcinoma "in situ". Todos estes apresentam atipias epiteliais em diferentes graus, e riscos variáveis de progredir para carcinoma invasor.

Em 1976 (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990), a terminologia foi simplificada para carcinoma "in situ" e atipia vulvar. O primeiro englobando todas as variantes histológicas do carcinoma intraepitelial, e as atipias designadas como lesões análogas à displasia da cérvix uterina (Tabela 1).

TABELA 1

Classificação das neoplasias intraepiteliais vulvares (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990)

Terminologia anterior 1976	Terminologia atual 1986 (*)
atipia leve	VIN I - displasia leve
atipia moderada	VIN II - displasia moderada
atipia intensa	VIN III - displasia acentuada
carcinoma "in situ"	VIN III - carcinoma "in situ"
Neoplasias intraepiteliais não escamosas	
doença de Paget	doença de Paget
melanoma "in situ"	melanoma "in situ"

(*) ISSVD

Em 1986 (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990), no VIII Congresso Mundial da Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (ISSVD), foi recomendado o uso da terminologia **neoplasia intraepitelial vulvar** (NIV, ou VIN do inglês), para todas as alterações celulares restritas ao epitélio vulvar, incluindo os epitélios atípicos de diferentes intensidades, e o carcinoma "in situ" dentro do termo VIN (Tabela1).

Junto com o aumento na frequência das neoplasias intraepiteliais, foi observada uma diminuição na idade média das mulheres com este diagnóstico, estando anteriormente a média ao redor de 47 anos (HUSSEINZADEH et al., 1989) e atualmente, 39 anos (BUSCEMA et al., 1988; FU & REAGAN, 1989; BENEDET, WILSON, MATISIC, 1991; HØRDING et al., 1991; PARK et al., 1991a). Entretanto, em alguns trabalhos, a idade média encontra-se ao redor de 53 anos (RAGNARSSON et al., 1987; BARBERO et al., 1990, 1993).

3.1.1. Aspectos clínicos

Clinicamente, cerca de 26% a 62% das pacientes são assintomáticas, sendo as lesões apenas detectadas durante o exame de rotina (BUCKLEY et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989; PRAT, 1991). Quando existe, a principal queixa é de prurido vulvar, que ocorre em aproximadamente 50% das pacientes sintomáticas (BUCKLEY et al., 1984; POWELL et al., 1986; HUSSEINZADEH et al., 1989; SHAFI et al., 1989; PRAT, 1991).

As pacientes podem apresentar outras lesões vulvares associadas, sendo o condiloma particularmente comum naquelas com menos de 40 anos e que mostram VIN multifocal (BUCKLEY et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989).

Cerca de 70% das lesões envolvem os grandes e pequenos lábios, e períneo (POWELL et al., 1986; BAGGISH et al., 1989; FU & REAGAN, 1989; BENEDET et al., 1991; PRAT, 1991).

3.1.2. Aspectos macroscópicos

O aspecto macroscópico da lesão é variável. Tipicamente são discretamente elevadas, bem definidas, com bordos irregulares; podem ser esbranquiçadas, eritematosas, hiperpigmentadas, discretas ou coalescentes. Sessenta por cento das lesões retêm o azul de toluidina a 1% (BUCKLEY et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989; PRAT, 1991; REID & GREENBERG, 1991).

Pela grande variabilidade da aparência macroscópica das lesões de VIN e ausência de sintomas em numerosas pacientes, deve-se fazer exame rotineiro cuidadoso, com biópsia de todas as áreas suspeitas, para diagnóstico precoce das lesões vulvares (FU & REAGAN, 1989).

3.1.3. Aspectos histológicos

O diagnóstico histológico de lesão pré-cancerosa em epitélio escamoso, é dado pelas marcadas anormalidades na diferenciação epitelial e na morfologia celular.

Os queratinócitos apresentam um distúrbio no processo de maturação: disqueratose ou, as células retêm as características de uma célula imatura como alto índice mitótico, aumento da relação núcleo-citoplasma e basofilia do citoplasma na sua progressão para as camadas mais superficiais do epitélio. As alterações na morfologia celular estão também representadas por atipias nucleares como: variação do volume, hiperchromatismo, multinucleação e mitoses atípicas. Nota-se a perda da polaridade celular levando ao desarranjo arquitetural do epitélio (FU & REAGAN, 1989).

Mais de 50% dos casos mostram comprometimento dos apêndices cutâneos (BAGGISH et al., 1989; FU & REAGAN, 1989; PRAT, 1991).

Em resumo, a neoplasia intraepitelial vulvar é caracterizada pelo crescimento anormal do epitélio escamoso vulvar exibindo alteração da maturação celular, associada à atipia nuclear (WILKINSON, 1986; WILKINSON et al., 1990; PRAT, 1991).

3.1.3.1. Graduação da neoplasia intraepitelial vulvar (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990)

Quando se estabelece o grau de alteração, deve-se considerar a qualidade e quantidade de atipias celulares individuais, junto com a densidade relativa da população celular e a arquitetura do epitélio. Desta forma denominamos (Tabela1):

VIN I: quando as alterações são em pequeno número e confinadas ao 1/3 inferior do epitélio;

VIN II: quando as alterações envolvem até 2/3 do epitélio;

VIN III: quando as alterações celulares são acentuadas e envolvem mais do que 2/3 da espessura do epitélio. Engloba também o carcinoma "in situ", termo usualmente reservado para os casos onde as alterações epiteliais ocupam toda a extensão do epitélio.

3.1.3.2. Variantes histológicas

Encontramos na literatura os seguintes termos diferenciados histologicamente por alguns autores (BUCKLEY et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; PARK et al., 1991a; KURMAN, NORRIS, WILKINSON, 1992b):

- a) carcinoma "in situ" simples,
- b) carcinoma "in situ" do tipo bowenóide e,
- c) carcinoma do tipo diferenciado.

São denominados como **carcinoma simples**, lesões que apresentam características citológicas de malignidade bem definidas, porém as células atípicas são relativamente uniformes, semelhantes às células da camada basal, com manutenção da maturação na região mais superficial do epitélio. Os núcleos são volumosos, com mitoses e nucléolos proeminentes, embora não apresentem alterações nucleares bizarras. Nota-se alargamento e alongamento dos cones epiteliais, diferentes graus de hiperkeratose e parakeratose. São incomuns células disqueratóticas ou coilocitóticas. Corresponde a cerca de 24% das variantes histológicas (FU & REAGAN, 1989).

O padrão histológico **bowenóide**, é caracterizado pela proliferação desordenada de células imaturas com perda da polaridade celular, aumento da relação núcleo-citoplasmática, hiperkeratose nuclear, multinucleação, atipia e aumento do volume nuclear. Os núcleos apresentam maior variação na forma e volume, podendo ocorrer células gigantes mono ou multinucleadas. Há distúrbios de maturação como diskeratose e corpos redondos. O grau de maturação escamosa varia entre as lesões e na mesma lesão, e geralmente ela está presente na superfície do epitélio. Também é observado hiperkeratose, parakeratose e coilocitose, com freqüente hiperpigmentação da camada basal. Corresponde a cerca de 76% das variantes histológicas da neoplasia intraepitelial vulvar escamosa (FU & REAGAN, 1989).

O padrão **diferenciado** (WILKINSON et al., 1986; KURMAN et al., 1992b) é reservado para os casos em que as células apresentam citoplasma proeminentemente eosinófilo, com queratinização freqüente ou formação de estruturas semelhantes a pérolas córneas no epitélio envolvido. Os núcleos geralmente mostram nucléolos proeminentes, com cromatina vesiculosa. É forma rara de apresentação histológica.

É comum observar a associação entre as variantes simples e a bowenóide, sendo a lesão classificada de acordo com o tipo predominante (BUCKLEY et al., 1984; KURMAN et al., 1992b).

KURMAN et al. (1992b) classificam as variantes histológicas em: verrucosa ou condilomatosa, basalóide ou tipo usual, e diferenciada ou tipo simples. Segundo sua descrição histológica, o tipo verrucoso corresponderia ao bowenóide, o basalóide ao simples, e o tipo diferenciado ao também diferenciado, acima descrito.

Apesar dessas diferenças encontradas na conceituação e terminologia, todas as variantes estão atualmente agrupadas e designadas apenas como **neoplasia intraepitelial vulvar** pelo Comitê de Terminologia da ISSVD (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990).

3.1.4. Evolução e tratamento

A evolução do VIN é variável, podendo até regredir espontaneamente, principalmente em mulheres jovens (BUCKLEY et al., 1984; CRUM et al., 1984; BARBERO et al., 1990).

Sete a 44% das pacientes têm doença persistente ou recorrente após o tratamento, devido à alta frequência de multifocalidade ou lesões extensas, principalmente em mulheres com infecção pelo HPV associada (BUCKLEY et al., 1984; POWELL et al., 1986; RAGNARSSON et al., 1987; HØRDING et al., 1991; WOODRUFF, 1991).

Os trabalhos também mostram que 1/3 das pacientes com VIN III apresentaram previamente ou desenvolveram posteriormente carcinoma "in situ"

ou invasivo fora dos órgãos pélvicos (4% a 5%), ou em outro local do trato genitourinário (30% a 68%), sendo o mais comum no colo uterino (BUCKLEY et al., 1984; POWELL et al., 1986; RAGNARSSON et al., 1987; BORNSTEIN et al., 1988; BAGGISH et al., 1989). Isto sugere a exposição a carcinógenos locais ou sistêmicos persistentes (POWELL et al., 1986; BORNSTEIN et al., 1988).

A frequência do carcinoma "in situ" como precursor do carcinoma escamoso invasivo é controvertida, alguns autores achando-a infrequente (BUCKLEY et al., 1984; CRUM et al., 1984; HØRDING et al., 1991; PRAT, 1991; WOODRUFF, 1991) enquanto outros relatam progressão em até 1/3 dos casos (CHAFE et al., 1988). Numerosos trabalhos enfatizam a idade avançada, e principalmente a imunossupressão, como fatores importantes para a promoção da invasão (BUCKLEY et al., 1984; HØRDING et al., 1991; PRAT, 1991; CRUM, 1992).

Vários métodos alternativos de tratamento têm sido sugeridos (POWELL et al., 1986; SHAFI et al., 1989; BENEDET et al., 1991; WOODRUFF, 1991; BARBERO et al., 1993) como: vulvectomy simples, vulvectomy superficial ("skinning"), 5-fluorouracil tópico, imunoterapia, criocirurgia, laser de dióxido de carbono (CO₂), e a excisão local da lesão. Os resultados destes diferentes tratamentos são controversos e nenhum totalmente satisfatório devido à alta taxa de recorrência da lesão, independente do método utilizado (CRUM, 1982; CRUM, et al., 1984; POWELL et al., 1986; SHAFI et al., 1989). Os métodos destrutivos como a criocirurgia e o laser de CO₂, produzem bons resultados cosméticos mas impedem a análise histológica de toda a lesão para avaliação de um eventual foco de invasão.

Atualmente, tem sido sugerido em diversos trabalhos, tratamento conservador, como a ressecção completa da lesão com margens cirúrgicas de

aproximadamente 1cm (BUCKLEY et al., 1984; CHAFE et al., 1988; WOODRUFF, 1991; BARBERO et al., 1993).

3.2. Papulose bowenóide

Dentro do estudo das lesões intraepiteliais vulvares, devemos ainda destacar a chamada papulose bowenóide pelos diferentes conceitos existentes na literatura.

Este termo foi introduzido por WADE, KOPF, ACKERMAN em 1978 descrevendo-o como lesão peniana, tendo sido posteriormente também observada na vulva (WADE, KOPF, ACKERMAN, 1979; BERGERON et al., 1987). Em 1970, esta lesão já havia sido descrita por ¹LLOYD, como doença de Bowen pigmentada multicêntrica, na região inguinal.

Clinicamente são lesões papulosas bem delimitadas, castanho-avermelhadas, geralmente múltiplas e pequenas, na região anogenital de ambos os sexos (WADE et al., 1979; BHAWAN, 1980; TAYLOR & SOUTH, 1981; PATTERSON et al., 1986). Há um leve predomínio em mulheres, com idade média de 32 anos e pico de incidência na terceira década (WADE et al., 1978, 1979; BHAWAN, 1980; TAYLOR & SOUTH, 1981; PATTERSON et al., 1986).

A possibilidade de etiologia infecciosa para estas lesões foi aventada após a observação de que múltiplas lesões ocorrem simultaneamente e a partir da existência de história prévia de infecção viral em numerosos pacientes (WADE et al., 1978, 1979; BHAWAN, 1980; TAYLOR & SOUTH, 1981). Estudos pela

¹ LLOYD, K.M. apud FU, Y.S. & REAGAN, J.W. - *Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1989 - 397p. (Major Problems in Pathology, 21)

técnica da imunoperoxidase revelaram que 5% a 33% destas lesões apresentam o antígeno comum do capsídeo do HPV (PATTERSON et al., 1986; SUGASE et al., 1989). Através da hibridização do DNA, foi demonstrado a presença do HPV tipo 16 em quase todos os casos estudados (BERGERON et al., 1987; SUGASE et al., 1989).

Apesar da aparência clínica benigna, histologicamente corresponde à neoplasia intraepitelial vulvar graus II ou III, com aspecto de doença de Bowen (BHAWAN, 1980; TAYLOR & SOUTH, 1981; BERGERON et al., 1987). Além disso, pela análise da quantidade de DNA, através da microespectrofotometria, foi observado que 92% destas lesões são aneuplóides (BERGERON et al., 1987).

Inúmeros trabalhos tentam fazer uma distinção histológica entre papulose bowenóide e doença de Bowen (TAYLOR & SOUTH, 1981; PATTERSON et al., 1986; SUGASE et al., 1989). Outros, consideram a papulose bowenóide separadamente como uma entidade anátomo-clínica (BHAWAN, 1980; PATTERSON et al., 1986). Entretanto, alguns autores (BHAWAN, 1980; CRUM, 1987; FU & REAGAN, 1989), não encontraram características histopatológicas que possam reconhecê-la como uma entidade em separado, considerando-a como neoplasia intraepitelial vulvar.

O comportamento clínico destas lesões é geralmente benigno, podendo em uma grande porcentagem dos casos haver regressão espontânea (WADE et al., 1979; BHAWAN, 1980; TAYLOR & SOUTH, 1981; PATTERSON et al., 1986; PLANNER & HOBBS, 1988). Entretanto, são descritos casos recorrentes (TAYLOR & SOUTH, 1981; PATTERSON et al., 1986), outros que persistem como carcinoma "in situ" (TAYLOR & SOUTH, 1981), ou que evoluem para carcinoma invasor (BERGERON et al., 1987; PLANNER & HOBBS, 1988), comprovando que o comportamento desta lesão é semelhante ao VIN (BHAWAN, 1980; BERGERON et al., 1987).

Por isso, a Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (WILKINSON et al., 1986), não aceita a denominação **papulose bowenóide** como termo anatomopatológico, não o recomendando como diagnóstico histopatológico ou mesmo clínico, e o engloba dentro das neoplasias intraepiteliais vulvares, requerendo assim tratamento local adequado não agressivo, com seguimento das pacientes (TAYLOR & SOUTH, 1981; PATTERSON et al., 1986, BERGERON et al., 1987). Apesar disto, o nome papulose bowenóide persiste ainda em trabalhos recenets (PLANNER & HOBBS, 1988; SUGASE et al., 1989).

3.3. Carcinoma escamoso da vulva, estágio Ia

Sinonímia: Carcinoma microinvasivo (BUCKLEY et al., 1984; ZUCKER & BERKOWITZ, 1985; ATAMDEDE & HOOGERLAND, 1989; FU & REAGAN, 1989; PODCZASKI et al., 1990), carcinoma superficialmente invasivo (WILKINSON, 1985, 1987, 1991; KURMAN et al., 1992b), carcinoma vulvar inicial (HACKER & VAN DER VELDEN, 1993).

Por analogia aos conceitos de neoplasia invasora inicial do colo uterino, cuja evolução é mais favorável, implicando em um comportamento menos agressivo e representado pela raridade ou ausência de metástases, tem sido proposto por numerosos investigadores uma série de definições de micro-invasão na vulva. Diferentemente do colo, ainda não há consenso entre os diferentes grupos de estudo quanto aos critérios histológicos adotados para o diagnóstico de microinvasão da vulva (BUCKLEY et al., 1984).

A grande importância desta definição está no sentido de se tentar um tratamento menos agressivo, visto que a cirurgia tradicional para carcinoma

vulvar, isto é, vulvectomy radical com linfadenectomia bilateral (NOUMOFF & FARBER, 1986; WILKINSON, 1991; KELLEY et al., 1992; HACKER & VAN DER VELDEN, 1993), possui grande morbidade pós-operatória, além de interferir na função sexual e provocar efeito psicológico muito importante sobre a imagem corporal (KELLEY et al., 1992; HACKER & VAN DER VELDEN, 1993). Além disso, os autores não acreditam que este tipo de tratamento aumente a sobrevida ou diminua as recorrências (RUTLEDGE et al., 1991; WILKINSON, 1991; HACKER & VAN DER VELDEN, 1993).

O conceito de carcinoma superficialmente invasivo foi primeiro introduzido por ²FRANKLIN & RUTLEDGE em 1971. Posteriormente em 1974, ³WHARTON, GALLAGER, RUTLEDGE utilizaram o termo carcinoma microinvasivo da vulva, querendo identificar um grupo de pacientes que não precisariam de cirurgia radical. Foi primeiro definido como lesão menor ou igual a 2 centímetros (cm) de diâmetro e invasão menor ou igual a 5 milímetros (mm).

Numerosos estudos relacionando a profundidade de invasão com a incidência de metástases ganglionares mostraram considerável controvérsia (BUCKLEY et al., 1984; ZUCKER & BERKOWITZ, 1985; PODCZASKI et al., 1990). Além disto, o método de medição empregado e os procedimentos com a peça cirúrgica não foram uniformes nos diferentes trabalhos (BUCKLEY et al., 1984; WILKINSON, 1985, 1991).

Desta forma, os que definem carcinoma superficialmente invasivo como lesão menor ou igual a 2cm e com profundidade máxima de invasão de 5mm, encontraram incidência de metástases ganglionares variando de 0% a 36%,

² FRANKLIN, E.W. & RUTLEDGE, F.D. apud WILKINSON, E.J. - Superficially invasive carcinoma of the vulva. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 34:651-61, 1991.

³ WHARTON, J.T.; GALLAGER, S.; RUTLEDGE, F.N. apud WILKINSON, E.J. - Superficially invasive carcinoma of the vulva. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 34:651-61, 1991.

estando a média entre 10% a 15%, número este considerado alto (BUCKLEY et al., 1984; WILKINSON, 1987, 1991; FU & REAGAN, 1989).

Quando foi considerada a profundidade máxima de invasão de até 3mm, as metástases ganglionares ocorreram em cerca de 6% a 12% dos casos (WILKINSON, 1987, 1991; FU & REAGAN, 1989; PRAT, 1991).

Entretanto, quando foi restringida a profundidade de invasão para 1mm, não se encontraram metástases ganglionares (WILKINSON, 1987, 1991; FU & REAGAN, 1989; PRAT, 1991; HACKER & VAN DER VELDEN, 1993) ou foram muito raras (ATAMDEDE & HOOGERLAND, 1989), sendo importante o método de padronização da medição, segundo recomendação da ISSVD, para comparação dos resultados (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990, 1991).

Em 1983 (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990, 1991) e, posteriormente em 1986 (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990, 1991) o Comitê de Terminologia da ISSVD, propôs o conceito de carcinoma escamoso da vulva estágio Ia, em relação ao estágio I da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia), definindo-o como: lesão única, medindo 2cm ou menos de diâmetro, e com profundidade máxima de invasão menor ou igual a 1mm. São considerados neste grupo, lesões com ou sem invasão vascular (BUCKLEY et al., 1984; NOUMOFF & FARBER, 1986).

Os carcinomas escamosos estágio Ia, ao contrário das neoplasias intraepiteliais vulvares grau III, raramente são multifocais, e quando o são, independentemente do grau de invasão, não são considerados como estágio Ia, e necessitam de cirurgia mais extensa que os unifocais (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990). O padrão de invasão microscopicamente múltiplo, separado por áreas de epitélio normal ou de VIN III, em **lesões clinicamente**

únicas, não é considerado como multifocal, o que ocorre em cerca de 22% dos casos (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1987).

Aproximadamente 60% a 83% dos carcinomas vulvares estágio Ia contêm áreas adjacentes de VIN III associadas, e atipias coilocitóticas (A.K.) em 50% das lesões (WILKINSON, 1991; KELLEY et al., 1992).

Apesar desta padronização, trabalhos recentes ainda não usam o conceito proposto pela ISSVD (BERMAN et al., 1989; PODCZASKI et al., 1990).

Os problemas maiores estão em definir critérios objetivos e facilmente reprodutíveis para todos os patologistas, principalmente na padronização das medidas. O que se procura obter é o estágio clínico apurado e sistematizado, que possa ter crédito e influenciar a conduta terapêutica, a qual também é controvertida. Os métodos de tratamento variam desde a excisão local até a vulvectomy radical (WILKINSON, 1985, 1991; ZUCKER & BERKOWITZ, 1985; BERMAN et al., 1989).

Os métodos de medição são muito variáveis (Figura 1), com opiniões divergentes entre os autores, apresentando vantagens e desvantagens quando comparados entre si. A ISSVD (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990) recomenda que a profundidade de invasão seja definida como a medida vertical a partir da junção dermo-epidérmica da papila dérmica mais superficial adjacente ao tumor, até o ponto mais profundo da invasão tumoral, através de ocular calibrada.

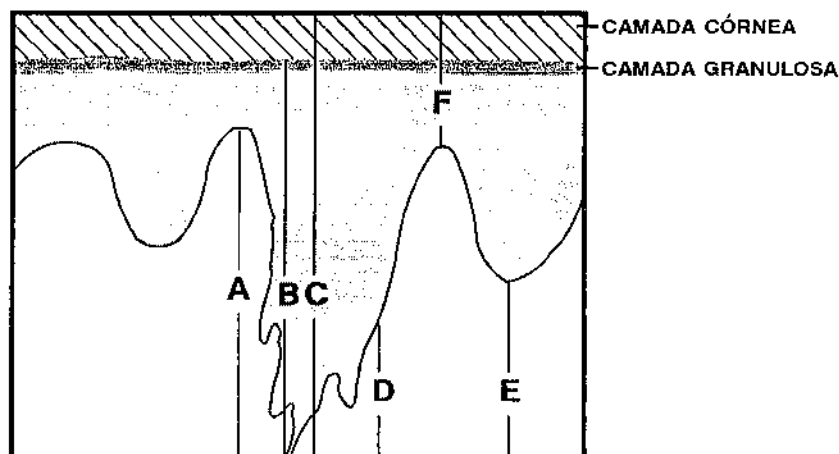


FIGURA 1 - Descrição esquemática de diferentes métodos de medição da profundidade máxima de invasão do carcinoma escamoso da vulva, segundo diferentes trabalhos.

Utilizamos o método A, medindo a partir da junção dermo-epidérmica da papila dérmica mais superficial adjacente ao tumor (WILKINSON, 1987).

Assim como a invasão suscita divergências de opiniões, isto também ocorre quanto ao diâmetro do tumor, anaplasia celular, envolvimento vascular e padrão de crescimento do tumor (BUCKLEY et al., 1984; ZUCKER & BERKOWITZ, 1985; RUTLEDGE et al., 1991; WILKINSON, 1991; KELLEY et al., 1992).

Até que sejam realizados mais trabalhos de acompanhamento destas lesões de carcinoma escamoso da vulva estágio Ia, a própria ISSVD (WILKINSON et al., 1986; WILKINSON, 1990) sugere que o termo carcinoma micro-invasivo não seja utilizado.

O laudo anatomopatológico deve fornecer o máximo de informações como: diâmetro e espessura do tumor, profundidade de invasão, método de medição empregado, padrão de crescimento tumoral (infiltrativo ou compressivo), graduação histológica, ulceração, envolvimento vascular, e margens cirúrgicas (ZUCKER & BERKOWITZ, 1985; CRUM, 1987; WILKINSON, 1991; KELLEY et al., 1992). Estas informações serão úteis para a padronização e acompanhamento das lesões, destacando em estudos de seguimento quais dados são os fatores prognósticos mais importantes na evolução.

Para o carcinoma escamoso vulvar estágio Ia, sugere-se tratamento menos agressivo, sendo atualmente recomendada a ressecção ampla da lesão, com margens de 1cm a 3cm, com ou sem linfadenectomia ipsi ou bilateral (ZUCKER & BERKOWITZ, 1985; NOUMOFF & FARBER, 1986; BERMAN et al., 1989; WILKINSON, 1991; KELLEY et al., 1992). Na ausência de linfonodos palpáveis ou clinicamente suspeitos, sem espaços vasculares acometidos pela neoplasia, ou de um padrão de crescimento do tipo infiltrativo, é adequado somente a realização de excisão ampla local sem linfadenectomia (KURMAN et al., 1992b).

3.4. Estudos sobre a patogênese

A patogênese destas lesões vulvares é considerada multifatorial, não estando até o momento completamente esclarecida.

3.4.1. Estudos epidemiológicos

Estudos epidemiológicos de pacientes com neoplasia vulvar revelam que fatores ambientais possuem um papel importante na gênese das lesões intraepiteliais e invasivas da vulva. Entre estes fatores, destacam-se o fumo (ZUR HAUSEN, 1987; CRUM & BURKETT, 1989; GISSMANN, 1989; SEHGAL, KORANNE, SRIVASTAVA, 1989; NOFFSINGER, WITTE, FENOGLIO-PREISER, 1992), exposição a agentes físicos e químicos como a radiação ionizante pélvica e arsênico (MORIN et al., 1981; CRUM & BURKETT, 1989; FU & REAGAN, 1989; GISSMANN, 1989; NOFFSINGER et al., 1992), contraceptivos orais (HOWLEY & SCHLEGEL, 1988; KOUTSKY, GALLOWAY, HOLMES, 1988; GISSMANN, 1989; NOFFSINGER et al., 1992), hormônios de crescimento e esteróides (BERNARD, 1990), estado imune (ZUR HAUSEN, 1986; HOWLEY & SCHLEGEL, 1988; KOUTSKY et al., 1988; GISSMANN, 1989; NOFFSINGER et al., 1992), fatores genéticos (MORIN et al., 1981; WAGGONER et al., 1990), neoplasias urogenitais (FU & REAGAN, 1989; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; BARBERO et al., 1993) e, irritações crônicas e infecções vulvovaginais (BUCKLEY et al., 1984; POWELL et al., 1986; CRUM & BURKETT, 1989; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; SIEGSMUND, WAYSS, AMTMANN, 1991; BARBERO et al., 1993).

Também implicados na carcinogênese estão as infecções sexualmente transmissíveis como as doenças crônicas granulomatosas e sífilis (POWELL et al., 1986; SEDLACEK et al., 1991; CRUM, 1992; BARBERO et al., 1993).

Quanto às lesões distróficas vulvares, isto é, o líquen escleroso e a hiperplasia escamosa (WILKINSON, 1990), os estudos são discordantes, sendo o seu potencial maligno difícil de se determinar (BUSCEMA & WOODRUFF, 1980; CRUM & BURKETT, 1989; BARBERO et al., 1993). A julgar por diferentes trabalhos, a frequência de carcinoma em associação com distrofia

vulvar varia de 0% a 75%, estando em média ao redor de 5% a 10%, sendo mais freqüente na presença de lesões hiperplásicas com atipias celulares, atualmente denominadas como VIN (NOUMOFF & FARBER, 1986; CRUM & BURKETT, 1989; FU & REAGAN, 1989; BARBERO et al., 1990; TOKI et al., 1991; WILKINSON, 1991; CRUM, 1992).

3.4.2. Vírus do herpes simples (HSV2)

No início dos anos setenta, o vírus do herpes simples tipo 2 (HSV2) foi muito estudado, tentando-se associá-lo ao carcinoma do trato genital feminino inferior (CRUM, 1987; ZUR HAUSEN, 1987).

É sabido que alguns vírus do grupo herpes-vírus são capazes de causar transformação maligna em cultura de tecidos ou animais experimentais, como por exemplo o Epstein-Barr e o citomegalovírus (ZUR HAUSEN, 1982).

O primeiro trabalho mencionando a relação entre HSV2 e carcinoma do colo uterino foi realizado em 1966 por ⁴NAIB, NAHMIAS, JOSEY.

Os trabalhos associando o HSV2 na carcinogênese genital, em especial no colo do útero, basearam-se principalmente em estudos sero-epidemiológicos, os quais mostraram níveis de anticorpos sangüíneos contra o HSV2 maior, e em mais elevado número de pacientes com carcinoma cervical em relação à população em geral, e mais raramente, através de exames imuno-histoquímicos (CRUM, 1982; KORHONEN et al., 1982; ZUR HAUSEN, 1982; BROWN & FIFE, 1990).

⁴NAIB, Z.M.; NAHMIAS, A.J.; JOSEY, W.E. apud RUBINSTEIN, E. - Probably virus - induced epithelial lesions in preinvasive cervical cancer. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 59:529-34, 1980.

Entretanto, outros estudos utilizando métodos sorológicos, de imuno-histoquímica e hibridização do DNA, não conseguiram demonstrar consistentemente a presença do HSV2 na população de pacientes com carcinoma do trato genital, levando-os à pesquisa de outros agentes etiológicos, entre eles, o HPV (ZUR HAUSEN, 1982, 1987; CRUM, 1987; BROWN & FIFE, 1990; NAIR & PILLAI, 1992).

Poucos trabalhos atualmente identificam a importância do papel do HSV2 na carcinogênese genital, sendo as evidências inconclusivas (ZUR HAUSEN, 1982; BROWN & FIFE, 1990).

Acredita-se que o HSV2 tenha um papel indireto na patogênese destas lesões. Alguns autores apontam como provável um sinergismo entre o HSV2 e o HPV, o qual promoveria uma transformação celular mais eficiente (ZUR HAUSEN, 1982; DILUCA et al., 1987; KOUTSKY et al., 1988; NAIR & PILLAI, 1992). Entre os mecanismos através dos quais o HSV2 cooperaria para a transformação celular estão: facilitação da integração do HPV no genoma da célula hospedeira, ativação de oncogenes, alteração de genes supressores celulares, ou atuação como um mutagênico (ZUR HAUSEN, 1982; DILUCA et al., 1987).

O papel do HSV2 e sua relação com o HPV, na carcinogênese do trato genital feminino inferior é incerto, e ainda precisa ser melhor definido.

3.4.3. Vírus do papiloma humano (HPV)

A partir da década de oitenta, o HPV tornou-se o maior suspeito na gênese das neoplasias intraepiteliais e invasivas do trato genital feminino, sendo esta associação sustentada por grande número de estudos relacionando o HPV e neoplasia nos níveis clínico, epidemiológico, histológico, imuno-histoquímico e molecular (CRUM et al., 1982; CRUM, 1987; KLUZAK & KRAUS, 1987; FU & REAGAN, 1989; KREBS, 1989b; KURMAN, NORRIS, WILKINSON, 1992a).

A verificação de que a infecção pelo papilomavírus causa tumores benignos, levou à procura do seu papel na formação de neoplasias malignas.

Estudos experimentais "in vivo" e "in vitro", mostraram que os papilomavírus são capazes de induzir a transformação maligna em células humanas e de roedores (SYRJÄNEN, 1992). A oncogenicidade viral demonstrada em animais deu origem a enorme interesse acerca do possível papel destes vírus no carcinoma humano e no mecanismo envolvido na transformação neoplásica (RANDO, 1988; GISSMANN, 1989).

A análise do provável papel do HPV na carcinogênese humana iniciou-se há cerca de 17 anos através do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular (CRUM et al., 1982; KLUZAK & KRAUS, 1987; KURMAN et al., 1992a; NAIR & PILLAI, 1992; SYRJÄNEN, 1992). O descobrimento, o isolamento e a subclassificação dos tipos de HPV resolveram muitas questões concernentes à relação do HPV e diferentes formas de lesões pré-cancerosas, e suas características biológicas.

As evidências iniciais sugerindo que o HPV pode causar câncer no homem, vieram do estudo da Epidermodisplasia verruciforme (RANDO, 1988; KREBS, 1989b): uma doença hereditária autossômica recessiva, com depressão

da imunidade celular, que representa o modelo natural da oncogênese viral em humanos.

Estudos clínico-patológicos relacionando HPV e neoplasia do colo uterino iniciaram em 1977 com ⁵ MEISELS, FORTIN, ROY, os quais relataram a possibilidade de ocorrer transformação maligna nos condilomas (acuminado e plano) do colo uterino, podendo assim, a infecção pelo HPV ser um precursor da neoplasia cervical.

A partir daí, evidências circunstanciais, através de estudos epidemiológicos e experimentais, suportam fortemente o papel do HPV como agente causal das neoplasias do trato anogenital em ambos os sexos, incluindo a vulva, vagina, colo uterino, região anal e pênis (CRUM et al., 1982; REID et al., 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; PLANNER & HOBBS, 1988; ZUR HAUSEN, 1991).

A relação entre HPV e carcinogênese do trato genital feminino inferior foi mais profundamente estudada no colo uterino, sendo que as evidências associando infecção pelo HPV e neoplasia são baseadas nas observações de que: (SYRJÄNEN et al., 1987; LUCAS, 1988; GISSMANN, 1989; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; SYRJÄNEN, 1992).

- a infecção pelo HPV está associada a fatores de risco que também predis põem a mulher ao carcinoma do colo uterino;
- a história natural das lesões pelo HPV no colo é semelhante às das neoplasias intraepiteliais e invasoras do colo uterino; e ainda:

⁵ MEISELS, A.; FORTIN, R, ROY, M. apud FLETCHER, S. - Histopathology of papilloma virus infection of the cervix uteri: the history, taxonomy, nomenclature and reporting of koilocytic displasias. J. Clin. Pathol., 36:616-24, 1983.

- pela demonstração do envolvimento do HPV em lesões benignas, pré-neoplásicas e malignas, através de técnicas morfológicas, imuno-histoquímicas e de hibridização;
- pela presença de tipos de HPV associados à oncogênese, em tecido adjacente às lesões pré-malignas e malignas, na forma latente; e
- pela presença de modelos animais onde o papilomavírus induz a transformação maligna.

Além disso, concomitantemente ao aumento da frequência dos carcinomas "in situ" vulvar e cervical, houve um aumento na incidência da infecção pelo HPV, sugerindo um papel etiológico comum (CRUM, 1982; HØRDING et al., 1991).

Em relação às neoplasias intraepiteliais e invasoras da vulva, sua relação com o HPV foi observada através da alta associação destas lesões com condiloma ao nível histológico e através dos exames imuno-histoquímicos, por microscopia eletrônica, e da hibridização do DNA (KLUZAK & KRAUS, 1987; PLANNER & HOBBS, 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989; HØRDING et al., 1991).

A patogênese associando o HPV com o desenvolvimento de neoplasia ainda não está totalmente esclarecida, e é muito discutida, principalmente na região vulvar.

Quanto ao mecanismo patogênico envolvendo o HPV e as neoplasias de células escamosas, parece que há uma interação entre diversos fatores, onde sabidamente um fenômeno isolado não é capaz de promover a transformação maligna das células infectadas pelo vírus (SYRJÄNEN et al., 1987; ZUR HAUSEN, 1991; NOFFSINGER et al., 1992; GRIEP et al., 1993).

3.4.3.1. Morfologia e biologia do HPV

Diferentes tipos de papilomavírus humano estão envolvidos no desenvolvimento de uma variedade de lesões escamosas proliferativas da pele e mucosas (HOWLEY, 1982; REID et al., 1987; DE VILLIERS, 1989; NOFFSINGER et al., 1992).

Pertencem à família dos Papovaviridae e ao gênero Papillomavírus (SYRJÄNEN et al., 1987; KOUTSKY et al., 1988; REID & GREENBERG, 1991).

São vírus de DNA, apresentando uma unidade de ácido nucleico composta por cerca de 7900 pares de bases, que formam uma molécula circular de dupla fita, e peso molecular de aproximadamente cinco milhões de daltons. Externamente, contém um capsídeo proteico icosaédrico com cerca de 72 capsômeros, e 52 a 55 nanômetros de diâmetro (SINGER, CAMPION, McCANCE, 1985; SYRJÄNEN et al., 1987; KOUTSKY et al., 1988; REID & GREENBERG, 1991)

São extremamente espécie e sítio-específicos, e com potencial oncogênico variável de acordo com o tipo viral (BROWN & FIFE, 1990; WRIGHT & RICHART, 1990; REID & GREENBERG, 1991; NOFFSINGER et al., 1992).

A síntese viral ocorre dentro das células infectadas e a maturação do vírus está intimamente relacionada com a diferenciação do epitélio escamoso.

O HPV infecta o epitélio escamoso após microtraumas, a partir das células da camada basal, na forma de epissomos (DNA viral não integrado ao DNA da célula hospedeira). À medida que as células epiteliais se diferenciam, os vírus replicam (replicação vegetativa) nos núcleos de queratinócitos maduros da metade superior do epitélio escamoso, produzindo um alto número de cópias

virais. A ativação e a expressão dos genes virais é realizada através de sinais fisiológicos da célula hospedeira, como hormônios (glicocorticóides, hormônio de crescimento, progesterona), ou através do acoplamento da transcrição viral ao ciclo celular do hospedeiro. Além dos fatores do hospedeiro, o vírus também possui mecanismos intrínsecos de regulação da transcrição viral. Produtos dos genes virais interferem nos mecanismos de diferenciação e proliferação celular produzindo alterações fenotípicas do epitélio escamoso infectado, na fase de expressão ativa da doença (KOUTSKY et al., 1988; BERNARD, 1990; REID & GREENBERG, 1991; KURMAN et al., 1992a; NOFFSINGER et al., 1992).

Os estudos pormenorizados da biologia viral, dos mecanismos de regulação da replicação do vírus, e da oncogênese viral têm sido dificultados devido à inabilidade de crescimento e replicação dos papilomavírus em sistemas de cultura (KOUTSKY et al., 1988; DE VILLIERS, 1989; DEL VECCHIO et al., 1992; KURMAN et al., 1992a; SYRJÄNEN, 1992; VANDE POL & HOWLEY, 1992).

A maioria dos trabalhos realizados foi através do BPV1 (papilomavírus bovino tipo 1) como sistema modelo (DEL VECCHIO et al., 1992; VANDE POL & HOWLEY, 1992). Vírus clonados podem infectar certas culturas de células possibilitando a investigação da replicação viral, expressão gênica e transformação celular (KLEINHEINZ et al., 1989; VANDE POL & HOWLEY, 1992). Entretanto não há produção de partículas virais maduras, devido à necessidade de completa diferenciação celular para a expressão dos genes virais tardios (SINGER et al., 1985; KLEINHEINZ et al., 1989; VANDE POL & HOWLEY, 1992).

O primeiro trabalho que gerou infecção produtiva pelo HPV fora do homem, foi realizado por ⁶KREIDER et al. (1985). Isto foi muito importante, pois anteriormente não se conseguia gerar infecção produtiva ou alterações fenotípicas em células de cultura.

O aperfeiçoamento dos sistemas de cultura de tecidos para a obtenção de completa diferenciação de queratinócitos "in vitro", deverá auxiliar o estudo da biologia do papilomavírus e a sua relação com diferenciação e transformação celular.

Através do desenvolvimento da biologia molecular, incluindo a hibridização do DNA, ocorreu uma grande expansão dos conhecimentos em relação à biologia do vírus, possibilitando-se a partir do seqüenciamento do DNA viral, o estudo da organização do seu genoma e a identificação dos tipos e subtipos de papilomavírus (HOWLEY, 1982; KLUZAK & KRAUS, 1987; KOUTSKY et al., 1988; BROWN & FIFE, 1990).

Com o uso de endonucleases de restrição, que reconhecem e "quebram" o DNA em locais específicos, conseguiu-se identificar diferentes seqüências nucleotídicas em relação aos papilomavírus, podendo assim classificá-los em diferentes tipos com a utilização de padrões característicos de fragmentação do DNA viral (HOWLEY, 1982; KLUZAK & KRAUS, 1987; KOUTSKY et al., 1988; RANDO, 1988; DE VILLIERS, 1989)

Assim, os papilomavírus são identificados de acordo com o seu hospedeiro alvo e pelo seu genótipo. São classificados conforme o grau de homologia de sua seqüência nucleotídica e numerados pela ordem da sua descoberta.

⁶ KREIDER, J.W.; HOWETT, M.K.; WOLFE, S.A.; BARTLETT, G. L.; ZAINO, R.J.; SEDLACEK, T.V.; MORTEL, R. apud SYRJÄNEN, K.; GISSMANN, L.; KOSS, L.G. ed. - *Papillomaviruses and human disease*. Berlin, Springer - Verlag, 1987 - 518 p.

Vírus que compartilham menos de 50% de homologia do seu genótipo com outros tipos já definidos, são classificados como um novo tipo de papilomavírus. Os tipos específicos de PV (papilomavírus) são subclassificados como subtipos quando possuem mais de 50% de homologia, porém menos de 100%, e apresentam diferenças no padrão de clivagem através do uso das enzimas de restrição (endonucleases), sendo identificados por letra minúscula do alfabeto (SINGER et al., 1985; KOUTSKY et al., 1988; RANDO, 1988; DE VILLIERS, 1989).

Atualmente, mais de 60 tipos de papilomavírus humano estão caracterizados (BROWN & FIFE, 1990; NUOVO, 1990; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; DEL VECCHIO et al., 1992; NOFFSINGER et al., 1992) e suas expressões clínicas e morfológicas formam grupos característicos (REID et al., 1987; WRIGHT & RICHART, 1990; HALBERT, DEMERS, GALLOWAY, 1991; REID & GREENBERG, 1991; NOFFSINGER et al., 1992). Destes, pelo menos 20 tipos de HPV são encontrados em lesões do trato genital feminino inferior, como os tipos 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33-35, 39, 40, 42-45, 51-59 (KOUTSKY et al., 1988; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; WRIGHT & RICHART, 1990; SYRJÄNEN, 1992).

3.4.3.2. Organização do genoma viral (Figura 2)

A organização do genoma viral foi primeiramente determinada para o papilomavírus bovino tipo 1 em 1982 por ⁷CHEN et al.. Há uma organização geral bem conservada entre os diferentes tipos de papilomavírus, com uma

⁷CHEN, E.Y.; HOWLEY, P.M.; LEVINSON, A.D.; SEEBURG, P.H. apud SYRJÄNEN, K.; GISSMANN, L.; KOSS, L.G., ed. - *Papillomaviruses and human disease*. Berlin, Springer - Verlag, 1987. 518 p.

configuração básica de seqüências codificadoras de proteínas (ORF - open reading frames), as quais estão restritas a uma fita de DNA (SYRJÄNEN et al., 1987). A maioria dos ORFs dos diferentes tipos de papilomavírus ocupam posição similar entre si, sem diferença substancial no comprimento dos ORFs homólogos; mas diferem nas seqüências de nucleotídeos, que podem ser demonstradas através das técnicas de biologia molecular (SYRJÄNEN et al., 1987).

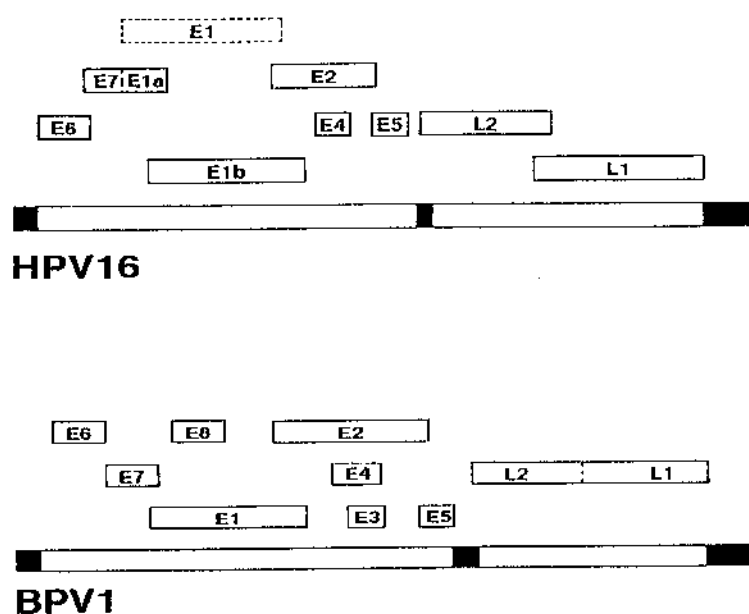


FIGURA 2 - Organização do genoma do HPV16 e BPV1 (SYRJÄNEN et al., 1987)

O genoma viral pode ser dividido em três segmentos funcionais (REID & GREENBERG, 1991):

a) região inicial ("early region")

São seqüências de nucleotídeos responsáveis pela codificação de proteínas virais envolvidas no controle da replicação do DNA, na transcrição do RNA (ácido ribonucleico) viral, e que induzem a transformação das células do hospedeiro. Estes genes são expressos na camada basal do epitélio escamoso **"inicialmente"** logo após a infecção e antes da replicação do DNA viral, e assim, denominados como "early" de acordo com a seqüência cronológica específica durante a qual são ativados, em relação à região tardia.

São 8 seqüências codificadoras (ORFs), denominadas de E1 a E8. Os produtos dos genes iniciais estão melhor estudados no BPV1 e resumidamente, estão relacionados a (SYRJÄNEN et al., 1987; WRIGHT & RICHART, 1990; BERNARD, 1990; REID & GREENBERG, 1991; NOFFSINGER et al., 1992):

E1 - função na replicação do DNA viral, isto é, modulador do número de partículas virais epissomais

E2 - regulação da transcrição viral; papel na replicação do DNA viral codificando proteínas que ativam outros genes virais iniciais

E3 - função desconhecida

E4 - papel na fase tardia do ciclo de replicação viral; envolvidos na maturação e reunião viral

E5 - induz a síntese do DNA das células hospedeiras; relacionado com a transformação celular

E6 - papel na transformação celular

E7 - papel na transformação celular e imortalização de linhagens celulares em cultura

E8 - possível papel na replicação do DNA viral

O E6 e E7 são importantes na indução e manutenção do estado maligno das células carcinomatosas.

b) região tardia

Os genes tardios codificam proteínas estruturais que formam o capsídeo viral. São ativados durante os estágios finais do ciclo viral e são expressos nas células diferenciadas da região mais superficial do epitélio escamoso da pele e mucosas (SYRJÄNEN et al., 1987; WRIGHT & RICHART, 1990; BERNARD, 1990; REID & GREENBERG, 1991; NOFFSINGER et al., 1992):

L1: codifica a proteína estrutural principal, a qual representa 80% das proteínas virais totais. Apresenta-se altamente conservada na maioria dos papilomavírus de animais e humanos, sendo usado como reagente imunocitoquímico grupo-específico em métodos de investigação para a detecção da presença do papilomavírus (SYRJÄNEN et al., 1987; REID & GREENBERG, 1991).

L2: codifica a proteína estrutural menor. Parece ser importante para a interação vírus-célula alvo. É altamente tipo-específico, servindo como ponto de distinção para tipagem imunocitoquímica dos tecidos infectados por diferentes tipos de papilomavírus (SYRJÄNEN et al., 1987; REID & GREENBERG, 1991).

c) região controladora longa (LCR ou URR, do inglês, Long Control Region ou Upstream Regulatory Region).

Região reguladora situada no limite entre as regiões iniciais e tardias do papilomavírus. É um segmento não codificador, envolvido na regulação da transcrição e replicação viral. Contém a origem da replicação do DNA viral, vários promotores (seqüências nucleotídicas necessárias para iniciar a síntese do DNA viral), amplificadores (seqüências necessárias para aumentar o índice de transcrição do RNA mensageiro) e, seqüências reguladoras da transcrição (SYRJÄNEN et al., 1987; BERNARD, 1990; WRIGHT & RICHART, 1990; REID & GREENBERG, 1991).

3.4.3.3. Fatores envolvidos na transformação neoplásica

3.4.3.3.1. Presença de tipos de HPV de alto risco nas lesões

Através da biologia molecular foi possível a subclassificação do HPV em tipos e subtipos virais, e um melhor entendimento no mecanismo molecular envolvido na replicação viral e na transformação celular (HOWLEY, 1982).

Certos tipos de HPV possuem potencial de imortalização, transformação celular e alteram o comportamento de diferenciação de queratinócitos, "in vitro" (KLEINHEINZ et al., 1989; KURMAN et al., 1992a.).

O comportamento biológico das lesões pré-cancerosas genitais é influenciado por tipos específicos de HPV. Sabe-se que certos genótipos de HPV estão preferencialmente associados com os carcinomas de células escamosas e lesões precursoras, sendo que evidências do potencial de progressão de lesões contendo estes tipos virais oncogênicos têm sido observados através de estudos prospectivos (LUCAS, 1988; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; REID & GREENBERG, 1991; SEDLACEK et al., 1991; NOFFSINGER et al., 1992).

Baseados no padrão clínico-patológico das lesões e no genótipo do HPV, estes são divididos em três categorias principais (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; REID & GREENBERG, 1991; SEDLACEK et al., 1991; SYRJÄNEN, 1992).

- tipos de baixo risco: HPV tipos 6, 11, 42, 43 e 44, presentes em lesões benignas e neoplasias intraepiteliais de baixo grau, com rara progressão para lesões de alto grau;
- tipos de risco intermediário: HPV tipos 31, 33, 35, 51 e 52, presentes em neoplasias intraepiteliais de baixo e alto grau, com rara progressão para neoplasia invasiva;
- tipos de alto risco: HPV tipos 16 e 18, predominantemente presentes em lesões de alto grau e invasivas, e em menor proporção, em neoplasia intraepitelial de baixo grau.

O motivo da não oncogenicidade de certos tipos de HPV não é conhecido, entretanto, parece ser por diferenças nas seqüências nucleotídicas do seu genoma e na biologia celular do vírus (SMOTKIN, PROKOPH, WETTSTEIN, 1989)

3.4.3.3.2. Expressão dos genes virais

Proteínas das regiões E6 e E7 do genoma do HPV tipos 16 e 18 têm sido constantemente detectadas em culturas de linhagens celulares derivadas do carcinoma do colo uterino (SYRJÄNEN et al., 1987; ZUR HAUSEN, 1991; NOFFSINGER et al., 1992; SCHEFFNER et al., 1992).

O potencial oncogênico do HPV é refletido "in vitro" pela sua habilidade de imortalizar queratinócitos e alterar o seu comportamento de crescimento e diferenciação (DEFEO-JONES et al., 1993; GRIEP et al., 1993).

As propriedades oncológicas do HPV são atribuídas às regiões E6 e E7 do genoma viral (PARK et al., 1991b), sendo que o gene E6 potencializa a ação do E7 (HALBERT et al., 1991; FUJITA et al., 1992). Os mecanismos através dos quais o E6 e E7 contribuem para o desenvolvimento do fenótipo maligno não são completamente compreendidos (CROOK & VOUSDEN, 1992; DEFEO-JONES et al., 1993).

A expressão constante de produtos gênicos específicos do HPV, em particular, dos genes E6 e E7, é requerida para iniciar e manter o fenótipo maligno (SYRJÄNEN et al., 1987; HALBERT et al., 1991; PARK et al., 1991b; ZUR HAUSEN, 1991; NOFFSINGER et al., 1992). Ambos possuem papel na imortalização e transformação celular através da codificação de oncoproteínas virais (HALBERT et al., 1991; ZUR HAUSEN, 1991; NOFFSINGER et al., 1992), da sua capacidade de se ligar a produtos proteicos de anti-oncogenes celulares e da modulação da atividade de fatores celulares (WILCZYNSKI et al., 1988; BERNARD, 1990; JEWERS et al., 1992).

Tem sido demonstrado através de estudos experimentais em queratinócitos humanos, que culturas de células infectadas com os genes E6 e E7 dos HPV tipos 16, 18, 31 e 33 podem ser indefinidamente mantidos "in vitro" (imortalização celular), e que estas linhagens celulares podem se transformar e adquirir capacidade de formar tumores. Entretanto, apesar de necessária, a expressão dos genes E6 e E7 não é suficiente para o desenvolvimento do crescimento maligno, requerendo co-fatores adicionais (ZUR HAUSEN, 1991; KURMAN et al., 1992a).

O potencial oncogênico dos diferentes tipos de HPV, isto é, de alto e baixo risco, é atribuído à variação na atividade biológica das oncoproteínas virais, baseadas em diferenças nas suas propriedades bioquímicas, na expressão dos genes virais E6 e E7, e no potencial intrínseco de seus produtos proteicos (HALBERT et al., 1991; VILLA & BRENTANI, 1991; ZUR HAUSEN, 1991; NOFFSINGER et al., 1992; GRIEP et al., 1993). Produtos da região E7 dos HPV tipos 6 e 11 possuem fraca capacidade de imortalização e transformação celular (JEWERS et al., 1992; SCHEFFNER et al., 1992).

3.4.3.3. Estado físico do genoma viral

Em animais, a integração do DNA viral à célula hospedeira é pré-requisito para a transformação celular (SINGER & McCANCE, 1985), enquanto que no homem, o estado físico do DNA viral nos carcinomas é muito variável, sendo freqüentemente epissomal, isto é, não integrado, nos carcinomas escamosos de indivíduos com Epidermodisplasia verruciforme (SYRJÄNEN et al., 1987; HOWLEY & SCHLEGEL, 1988).

Na região anogenital, o HPV é freqüentemente encontrado na forma epissomal em lesões benignas ou pré-neoplásicas, enquanto que a forma integrada é demonstrada na maioria das lesões cancerosas invasivas (SYRJÄNEN et al., 1987; ZUR HOUSEN, 1991; HAWLEY & SCHLEGEL, 1988; MILDE-LANGOSCH, BECKER, LÖNING, 1991). Em pequena porcentagem de casos encontra-se o vírus não integrado em carcinomas (FUKUSHIMA et al., 1990; MILDE-LANGOSCH et al., 1991; ZUR HAUSEN, 1991; DAS et al., 1992; SNIJDERS et al., 1992) ou formas integradas em lesões benignas e pré-cancerosas (KOUTSKY et al., 1988; DAS et al., 1992).

O estado físico do DNA viral interfere na estrutura das proteínas virais sintetizadas, afeta a regulação da expressão gênica do vírus e a interação entre o papilomavírus e a célula hospedeira (SYRJÄNEN et al., 1987; NOFFSINGER et al., 1992).

A integração do DNA do vírus na célula hospedeira parece desencadear a expressão desregulada dos genes virais, em especial do E6 e E7, os quais possuem importante papel na oncogênese (LUCAS, 1988; CRUM & BURKETT, 1989; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN 1990; DAS et al., 1992; SNIJDERS et al., 1992).

Tem sido demonstrado que no HPV integrado há interrupção de um sítio específico, ao nível da região E2 (WILCZYNSKI et al., 1988; VILLA & BRENTANI, 1992; ZUR HAUSEN, 1991; NAIR & PILLAI, 1992; NOFFSINGER et al., 1992), responsável pela função de regulação da transcrição de outros genes virais, atuando inclusive ao nível da região controladora longa. Com a inativação da função repressora da transcrição da região E2, há aumento da transcrição das regiões E6 e E7.

Entretanto, alguns estudos mostram que mesmo com a produção do E2 em cultura, há aumento dos produtos de transcrição das regiões E6 e E7, sugerindo que somente a interrupção do E2 não é a causa do aumento destes transcritos (VILLA & BRENTANI, 1991; SNIJDERS et al., 1992).

Com a integração do DNA viral podem ocorrer anomalias cromossômicas, alterações de proto-oncogenes e amplificação gênica da célula infectada, o que levaria à instabilidade genética e divisão celular incontrolada, aumentando a susceptibilidade celular a outros fatores carcinogênicos exógenos que poderiam auxiliar no processo de desenvolvimento neoplásico (SNIJDERS et al., 1992).

A integração do DNA viral na célula hospedeira ocorre ao acaso, ou seja, em local não específico e parece não interromper funções gênicas essenciais e nem ativar genes "silenciosos" (BUSCEMA et al., 1988; HOWLEY & SCHLEGEL 1988; WILCZYNSKI et al., 1988; ZUR HAUSEN, 1991). Entretanto, alguns trabalhos mostram a integração viral próxima ao sítio de proto-oncogenes celulares como o c-myc (SYRJÄNEN et al., 1987; HOWLEY & SCHLEGEL, 1988; WILCZYNSKI et al., 1988; NAIR & PILLAI, 1992; NOFFSINGER et al., 1992).

Assim, ainda não está claro se a integração é responsável pelas propriedades de invasão das células anormais. Ela pode ser um fator decisivo no desenvolvimento dos carcinomas genitais porém, por si só não é suficiente para explicar um fenômeno tão complexo (SYRJÄNEN et al., 1987; KOUTSKY et al., 1988; FUKUSHIMA et al., 1990; DAS et al., 1992; SNIJDERS et al., 1992).

3.4.3.3.4. Ativação de oncogenes celulares

Estudos sugerem a ativação e amplificação de oncogenes celulares como eventos adicionais na progressão das neoplasias do trato genital (GISMANN, 1989; MILDE-LANGOSCH et al., 1991; FUJITA et al., 1992; NAIR & PILLAI 1992; SYRJÄNEN, 1992).

Os proto-oncogenes estão envolvidos no crescimento e diferenciação celular, e quando ativados se transformam em oncogenes que possuem papel fundamental na geração do estado neoplásico por promover crescimento e diferenciação celular anormal (GRIEP et al., 1993).

Foi demonstrado que o gene E7 dos papilomavírus oncogênicos podem cooperar com oncogenes celulares como os genes *ras*, *c-myc*, *h-ras* e *c-erbB-2* (MILDE-LANGOSCH et al., 1991; NUOVO et al., 1991; NOFFSINGER et al., 1992; PHELPS et al., 1992; GRIEP et al., 1993). Além disso, foi observado em alguns carcinomas genitais, em especial, do colo uterino, a amplificação de certos oncogenes como o *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* e *h-ras* (SYRJÄNEN et al., 1987).

Entretanto, até o momento, a relação entre oncogenes e HPV é ainda obscura e especulativa.

3.4.3.3.5. Papel dos genes supressores tumorais celulares (anti-oncogenes)

A transformação maligna deve ser em parte devida à inabilidade do controle das células do hospedeiro, que é mediada pela expressão viral (KURMAN et al., 1992a). A ligação das oncoproteínas virais com os produtos dos genes supressores tumorais é responsável, pelo menos parcialmente, por alguns dos mecanismos bioquímicos cruciais que contribuem para a patogênese das alterações proliferativas induzidas pelo HPV (JEWERS et al., 1992; PHELPS et al., 1992; DEFEO-JONES et al., 1993; GRIEP et al., 1993).

Os genes *p53* e do retinoblastoma (RB) codificam proteínas celulares reguladoras do crescimento celular, possuindo papel no controle da replicação do DNA e do ciclo mitótico da célula (ZUR HAUSEN, 1991; NOFFSINGER et al., 1992).

O gene *p53* é o mais frequentemente envolvido na oncogênese humana e são descritas mutações deste gene em carcinomas do cólon, mama, pulmão e outros órgãos (FUJITA et al., 1992; SCHEFFNER et al., 1992). Estudos

experimentais demonstraram sítios específicos de ligação no gene E6 do HPV para o produto proteico do gene p53 e, no gene E7 para o produto proteico do gene do retinoblastoma (FUJITA et al., 1992; NAIR & PILLAI 1992; NOFFSINGER et al., 1992; PHELPS et al., 1992; GRIEP et al., 1993).

A capacidade de ligação das regiões E6 e E7 do HPV com os produtos dos anti-oncogenes p53 e RB é maior nos HPV de tipos 16 e 18 (mais oncogênicos) do que nos tipos 6 e 11 (VILLA & BRENTANI, 1991; ZUR HAUSEN, 1991; SCHEFFNER et al., 1992).

O complexo formado entre as proteínas virais das regiões E6 e E7 com os produtos proteicos dos genes p53 e RB, leva à degradação destes últimos, com bloqueio ou alteração da sua função. Conseqüentemente, há desregulação do ciclo celular, instabilidade cromossômica e aneuploidia, ocasionando proliferação celular incontrolada (FUJITA et al., 1992; JEWERS et al., 1992; PHELPS et al., 1992; SCHEFFNER et al., 1992; GRIEP et al., 1993).

Alguns autores têm demonstrado nos carcinomas do colo uterino não associados à infecção pelo HPV presença de mutação do p53, enquanto nos carcinomas que continham HPV o p53 não era mutante (JEWERS et al., 1992; SCHEFFNER et al., 1992; GRIEP et al., 1993). Entretanto, estes dados não são observados por outros autores (CROOK & VOUSDEN, 1992; FUJITA et al., 1992), que questionam a importância dos genes supressores tumorais com o HPV e a carcinogênese.

Portanto, as conseqüências da ligação e degradação dos anti-oncogenes com as oncoproteínas virais ainda são obscuras, porém, este evento isolado também não é suficiente para a transformação celular completa, necessitando de alterações genéticas adicionais (NOFFSINGER et al., 1992; PHELPS et al., 1992; GRIEP et al., 1993).

3.4.3.3.6. O papel de co-fatores

Sabe-se que a infecção pelo HPV é muito comum sendo que apenas uma pequena porcentagem dos casos, após um grande período de latência, desenvolve neoplasia. Além disso, também são detectados tipos virais de alto risco em lesões benignas (GISSMANN, 1989). Evidências epidemiológicas e experimentais mostram que somente a infecção pelo vírus não é suficiente para induzir o carcinoma, sendo que a conversão maligna depende da ação sinérgica do vírus com fatores adicionais como: idade, local e duração da lesão, imunidade, carcinógenos físicos ou químicos como o fumo e hormônios, fatores genéticos, agentes infecciosos, e doenças inflamatórias associadas (SINGER et al., 1985; CRUM & BURKETT, 1989; GISSMANN, 1989; SEHGAL et al., 1989; NOFFSINGER et al., 1992).

Entretanto, a natureza destes co-fatores e seus mecanismos de ação não estão completamente definidos.

Quanto à idade, acredita-se que o HPV possa influenciar o tempo requerido para a progressão das lesões virais para as pré-neoplásicas e neoplásicas. Isto vem da observação e do seguimento da infecção pelo HPV em pacientes jovens, cujas lesões rapidamente progridem para epitélios atípicos, diferentemente de mulheres com lesões intraepiteliais ou invasivas do trato genital não relacionadas ao HPV, que são geralmente de grupos etários mais avançados (CRUM, 1987; WELLS et al., 1987; KOUTSKY et al., 1988; FUKUSHIMA, 1990).

Quanto aos carcinógenos químicos ou físicos temos como exemplo o papel da luz solar nos indivíduos com Epidermodisplasia verruciforme na

indução do carcinoma escamoso da pele, a radioterapia nos pacientes com papiloma de laringe, o fumo e fatores dietéticos nas lesões de brônquios e esôfago (MORIN et al., 1981; ZUR HAUSEN, 1982; SINGER et al., 1985; SYRJÄNEN et al., 1987; LUCAS, 1988).

O fumo tem sido associado a tumores genitais em alguns trabalhos (ZUR HAUSEN, 1987; CRUM & BURKETT, 1989; GISSMANN, 1989; SEHGAL et al., 1989; NOFFSINGER et al., 1992). Foram detectadas substâncias mutagênicas na secreção vaginal de fumantes (FU & REAGAN, 1989; GISSMANN, 1989), e alguns autores acreditam que o fumo suprime a atividade dos linfócitos T "killers" (CRUM & BURKETT, 1989), correlacionando-o ao carcinoma do colo uterino.

Além dos agentes carcinogênicos físicos e químicos, também as inflamações e infecções do trato genital potencializam o desenvolvimento do carcinoma, contribuindo para a progressão clínica das lesões (FU & REAGAN, 1989; GISSMANN, 1989; SYRJÄNEN, 1992). Em vista da alta prevalência de múltiplas infecções sexualmente transmissíveis em pacientes com carcinoma de colo uterino, é sugerido uma interação entre o HPV e outros agentes infecciosos .

Os carcinógenos físicos, químicos ou biológicos, estimulam a proliferação e reparo celular, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro para adquirir a infecção pelo HPV, além de aumentar a probabilidade de mutação e favorecer a integração do genoma do HPV no DNA da célula hospedeira. Também poderiam ativar oncogenes celulares ou inativar genes supressores tumorais celulares (ZUR HAUSEN, 1987, 1991; KOUTSKY et al., 1988; GISSMANN, 1989; RUSK et al., 1991). A inativação de fatores celulares que regulam a transcrição viral, provavelmente causado por outros carcinógenos, leva à ativação de certos genes virais iniciais e à transcrição de fatores de

transformação pelo vírus que podem induzir a transformação maligna (GISSMANN, 1989).

A região controladora longa do genoma viral possui receptores que respondem aos fatores hormonais celulares, os quais promovem ativação da transcrição dos genes iniciais, principalmente os das regiões E6 e E7 do HPV (HOWLEY & SCHLEGEL, 1988; BERNARD, 1990; ZUR HAUSEN, 1991; NAIR & PILLAI, 1992; NOFFSINGER et al., 1992).

Além disso, os hormônios esteróides aumentam a susceptibilidade das células cervicais à infecção pelo HPV (MITTAL et al., 1993) e a atividade de proliferação celular (GISSMANN, 1989). Entre os hormônios envolvidos estão: progesterona, estrógeno (inclusive no uso de anticoncepcionais orais), glicocorticóides e fatores de crescimento.

O estrógeno parece promover alteração da resposta imune do hospedeiro e favorecer a infecção pelo HPV e a persistência ou progressão da doença (CRUM & BURKETT, 1989). O HPV aumenta a hidroxilação do estradiol e o metabólito resultante aumenta a expressão viral (AUBORN et al., 1991). O uso de anticoncepcionais orais e a gravidez também estimulam a produção dos genes iniciais virais e a atividade de crescimento celular, além de suprimirem a resposta imune à infecção pelo HPV (KOUTSKY et al., 1988; GISSMANN, 1989).

Também alguns fatores celulares ou extracelulares como a interleucina-6, gama-interferon e, leuco-regulina, reprimem a expressão dos genes iniciais do HPV (KYO et al., 1993).

Especial interesse tem sido focado nos mecanismos regulatórios de vários fatores de crescimento, muitos dos quais são produtos proteicos de oncogenes celulares, regulados por vários hormônios; entretanto, seu significado

ainda foi pouco estudado (SYRJÄNEN, 1992). Entre estes fatores, está o fator de crescimento epidérmico. Durante o processo de irritação crônica, há liberação de fatores de crescimento que se ligam a receptores na região controladora longa do genoma viral, estimulando a expressão gênica do vírus (SIEGSMUND et al., 1991); esta mostra-se intimamente associada a eventos específicos de controle do crescimento e diferenciação do epitélio escamoso. Foi observado o aumento do número de receptores para o fator de crescimento epidérmico conforme havia progressão do grau de displasia, sugerindo um papel deste fator na gênese da neoplasia intraepitelial cervical (MITTAL, 1992).

Alterações na imunidade modificam o curso da infecção pelo HPV. A transformação carcinomatosa do condiloma parece ser mais comum em indivíduos imunodeprimidos, resultante da falência dos mecanismos de controle da célula hospedeira sobre a expressão dos genes virais (ZUR HAUSEN, 1986, 1987; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; HØRDING et al., 1991; CROOK & VOUSDEN, 1992). Entretanto, o componente imunológico da resposta do hospedeiro ainda não é bem definido, com resultados contraditórios.

Entre as alterações imunológicas detectadas estão: alterações quantitativas ou qualitativas das células de Langerhans (KOUTSKY et al., 1988), anormalidade da relação das células linfóides T "killers" e supressoras (KOUTSKY et al., 1988; CRUM & BURKETT, 1989; NAIR & PILLAI, 1992), diminuição da produção de interleucina e de gama-interferon no sangue periférico (CRUM & BURKETT, 1989).

Estudos mostram o aumento da porcentagem de células T supressoras (OKT8) e diminuição das células T auxiliares (OKT4), com diminuição da relação OKT4/OKT8, embora esta alteração na imunocompetência seja de etiologia desconhecida, interrogando-se se o HPV seria capaz de suprimir diretamente o sistema imune (KOUTSKY et al., 1988).

As células de Langerhans são histiócitos intra-epiteliais processadores de antígenos, cuja função é a de apresentar os antígenos para a ativação das células T. Foram observadas alterações na densidade, distribuição e nas características funcionais e morfológicas destas células quando comparadas as lesões de condiloma e neoplasia intraepitelial com o epitélio normal (KOUTSKY et al., 1988; MORELLI et al., 1993). As alterações nas células de Langerhans foram observadas independentemente do tipo de HPV presente nas lesões. As implicações destes defeitos não são bem compreendidas, parecendo favorecer a infecção viral persistente. As causas destas alterações podem ser: secundárias à ausência dos fatores de maturação ou quimiotático, produzidos pelas células epiteliais ou, devido à presença de um fator inibidor da maturação das células de Langerhans. O HPV poderia agir através da inibição da produção do fator de maturação pelo epitélio ou, exercer um efeito citopático sobre as células de Langerhans através da infecção direta destas células (MORELLI et al., 1993).

3.4.3.3.7. Conteúdo do DNA celular (ploidia)

Finalizando, foi observado que as neoplasias intraepiteliais são aneuplóides, e que a aneuploidia está associada com a persistência ou progressão das lesões (CRUM et al., 1982; POWELL et al., 1986; SHAFI et al., 1989). Mudanças no padrão de ploidia em lesões associadas ao HPV de alto risco devem estar implicadas na alta incidência do desenvolvimento de tumores na região anogenital (CRUM et al., 1982; WAGGONER et al., 1990; ZUR HAUSEN, 1991). Questiona-se se há relação causal entre ploidia alterada e função do HPV. Ainda não foi provado se os produtos gênicos do HPV estão envolvidos na geração de aneuploidia, notou-se entretanto, que a alteração da ploidia parece estar relacionada com funções gênicas da região E7 (HASHIDA & YASUMOTO, 1991).

3.5. Métodos de investigação do HPV

Pela ausência de sistemas de cultura que permitam o seu crescimento, o diagnóstico de infecção pelo HPV é baseado em métodos morfológicos, imuno-histoquímicos e de biologia molecular incluindo o exame clínico, colposcopia, citologia, histopatologia, microscopia eletrônica, imunoperoxidase e hibridização do DNA (SINGER et al., 1985; SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; KURMAN et al., 1992a; SYRJÄNEN, 1992).

Evidências da presença do HPV em VIN, carcinoma invasor e mesmo em lesões benignas da vulva têm sido baseadas principalmente em três principais métodos de identificação do papilomavírus humano: microscopia eletrônica, exame imuno-histoquímico e biologia molecular. Cada um dos métodos de detecção do HPV depende do estado biológico da infecção. Como o DNA do

HPV está presente em todos os tipos de infecção, sua identificação é o método mais sensível, seguido pela detecção do antígeno do capsídeo do HPV através de exame imuno-histoquímico e identificação de partículas virais pela microscopia eletrônica (SYRJÄNEN et al., 1987).

A maturação das células é acompanhada por alterações no ambiente celular que aparentemente promovem a replicação do DNA viral para níveis detectáveis e para a expressão das proteínas virais, mostrando que o ciclo biológico do vírus está relacionado diretamente com o processo de diferenciação e maturação celular (CRUM, 1982, 1987; CRUM et al., 1982; STOLER & BROKER, 1986; PARK et al., 1991b). Quando não se detecta proteína ou DNA viral, é porque o índice de replicação e expressão do genoma viral está muito baixo na célula.

3.5.1. Microscopia óptica

Apesar do desenvolvimento da técnica de hibridização do ácido nucleico para a detecção de infecção pelo HPV, o diagnóstico microscópico através da citologia ou histologia, é atualmente ainda o método mais utilizado para o diagnóstico de infecção pelo HPV (SCHNEIDER, 1989). Comparando-se com as técnicas de biologia molecular, o diagnóstico microscópico é altamente específico, porém não muito sensível em relação à detecção do DNA; sendo que apenas 10% a 30% das infecções do papilomavírus humano são diagnosticadas através da citologia ou histologia (KOUTSKY et al., 1988; SCHNEIDER, 1989; SYRJÄNEN, 1990).

3.5.1.1. Citologia

A atipia coilocitótica é a marca citológica da infecção pelo HPV, sendo considerada por numerosos autores como patognomônica (SYRJÄNEN et al., 1987; SCHNEIDER, 1989).

Os efeitos citopáticos produzidos pela infecção do HPV foram primeiro descritas por ⁸AYRE em 1949 em citologias de colo uterino, sendo que em 1956, ⁹KOSS & DURFEE, introduziram o termo "atipia coilocitótica" para estas alterações; em 1976, ¹⁰MEISELS & FORTIN atribuíram estas alterações celulares ao HPV.

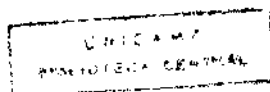
As atipias coilocitóticas são caracterizadas por: células epiteliais escamosas superficiais ou intermédias apresentando grande cavidade perinuclear, de aspecto claro, bem definida, e com anel periférico de citoplasma espessado. Os núcleos mostram-se atípicos, picnóticos ou volumosos, hipereromáticos, com grumos grosseiros de cromatina, irregularidade no contorno da membrana nuclear, e podem apresentar bi ou multinucleação (SINGER et al., 1985; KLUZAK & KRAUS, 1987; FU & REAGAN, 1989; SCHNEIDER, 1989; KURMAN et al., 1992b).

Também pode-se observar no exame citológico células disceratóticas, e grânulos de querato-hialina no citoplasma (SINGER et al., 1985; SCHNEIDER, 1989).

⁸ AYRE, J.G. apud SINGER, A.; CAMPION, M.J.; McCANCE, D.J. - Human papillomavirus. **Br. J. Hosp. Med.**, 34: 104-8, 1985.

⁹ KOSS, L.G.; DURFEE, G.R. apud SINGER, A.; CAMPION, M.J.; McCANCE, D.J. - Human papillomavirus. **Br. J. Hosp. Med.**, 34: 104-8, 1985

¹⁰ MEISELS, A.; FORTIN, R. apud SINGER, A.; CAMPION, M.J.; McCANCE, D.J. - Human papillomavirus. **Br. J. Hosp. Med.**, 34: 104-8, 1985.



3.5.1.2. Histologia

A acuracidade do diagnóstico morfológico em predizer a presença e o tipo de HPV é controverso (FRAMQUEMONT et al., 1989). As alterações histológicas sugerem a presença do HPV nas lesões embora tenha pouca relação com o tipo viral (CRUM, 1987; SCHNEIDER, 1989; PICH et al., 1992). O grau das alterações histológicas dependem do tipo do tecido infectado e do tipo viral (SINGER et al., 1985). Entre diferentes patologistas há maior concordância no diagnóstico histológico de infecção pelo HPV no colo uterino e menor na vulva (SPITZER et al., 1990).

As alterações histológicas de infecção viral são de intensidade variável nas lesões e ocorrem principalmente no terço superior do epitélio escamoso. Incluem: atipia coilocitótica, bi ou multinucleação, queratinização de células individuais, hiperkeratose, parakeratose, acantose, alongamento dos cones epiteliais, papilomatose, e hiperplasia da camada basal e parabasal do epitélio (SINGER et al., 1985; KLUZAK & KRAUS, 1987; FU & REAGAN, 1989; SCHNEIDER, 1989; SPITZER et al., 1990; KURMAN et al., 1992b).

A coilocitose, sugestiva de infecção pelo papilomavírus humano, é descrita em cerca de 1% a 3% das citologias oncóticas de rotina, em 25% a 50% das neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau, em 90% dos condilomas de vulva, 19% a 84% dos VIN III sendo a média ao redor de 50% e em aproximadamente 60% dos carcinomas invasivos de vulva (SINGER et al., 1985; KLUZAK & KRAUS, 1987; BUSCEMA et al., 1988; SHAFI et al., 1989; BARBERO et al., 1990; BENEDET et al., 1991). A atipia coilocitótica pode ser encontrada ao lado ou nas áreas de neoplasia intraepitelial. Deve ser lembrado porém, que nem todas as lesões de HPV exibem coilocitose.

3.5.2. Microscopia eletrônica

Detecta partículas virais maduras íntegras no núcleo das células infectadas.

A microscopia eletrônica foi o primeiro método de sucesso para identificar o HPV e o seu efeito citopático em tecidos humanos (CRUM, 1987).

Em 1970, ¹¹ORIEL & ALMEIDA demonstraram partículas virais em verrugas genitais humanas.

Os vírus, com 45 a 55 nanômetros de diâmetro, são demonstrados principalmente nos núcleos das células superficiais e intermédias do epitélio, principalmente nas células coilocitóticas, isolados ou em pequenos grupos, dispersos difusamente, ou mais comumente, organizados em um padrão cristalóide (CRUM et al., 1982; KLUZAK & KRAUS, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; FU & REAGAN, 1989; ROMAN & FIFE, 1989).

A concentração de partículas virais nas lesões varia com o tipo de verruga, sendo maior nas lesões cutâneas e menor nas genitais. Varia também com a idade da lesão, onde o maior pico de partículas ocorre ao redor de seis a 12 meses após a inoculação, diminuindo após 24 a 36 meses (SYRJÄNEN & PYRHÖNEN, 1982; SYRJÄNEN et al., 1987; KURMAN et al., 1992b).

Pelo menos 200 cópias virais dentro de um núcleo são necessárias para possibilitar a visualização convincente de dois a três partículas virais (KLUZAK & KRAUS, 1987).

Este método é de valor limitado, pois as verrugas genitais apresentam poucos vírus (SYRJÄNEN & PYRHÖNEN, 1982; KLUZAK & KRAUS, 1987;

¹¹ ORIEL, J.D. & ALMEIDA, J.D. apud FU, Y. S. & REAGAN, J.W. - *Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1989. 397 p. (Major Problems in Pathology, 21).

SYRJÄNEN et al., 1987) e é necessário que as partículas virais estejam intactas (KLUZAK & KRAUS, 1987) para a sua caracterização. Ademais, é uma técnica muito trabalhosa, sujeita a erros de amostragem e de artefatos de fixação, além de não identificar o tipo viral (KURMAN et al., 1981; SYRJÄNEN et al., 1987).

A presença de vírions intranucleares por microscopia eletrônica é detectada em cerca de 50% dos condilomas genitais (CRUM et al., 1982; SYRJÄNEN et al., 1987; WELLS et al., 1987; SYRJÄNEN, 1990; KURMAN et al., 1992b).

Em relação às neoplasias intraepiteliais no colo e na vulva os achados são variáveis, porém nas lesões de alto grau, e também nos carcinomas invasivos, partículas virais maduras são raramente identificadas, e, quando presentes, estão localizadas principalmente nas áreas de epitélio típico adjacentes à neoplasia (CRUM, 1982; SYRJÄNEN & PYRHÖNEN, 1982; SATO et al., 1986; SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989). Isto é devido à necessidade de maturação epitelial para a produção do vírus maduro (SYRJÄNEN et al., 1987).

A análise do efeito citopático viral, isto é, da atipia collocitótica, através da microscopia eletrônica, demonstrou as seguintes alterações celulares: núcleos picnóticos, com configuração angular, cromatina grosseira e agrupada na membrana nuclear a qual se apresenta irregular; o citoplasma mostra alterações principalmente perinucleares, com lise da matriz citoplasmática com acúmulo de fluidos, discreta quantidade de glicogênio, detritos celulares e vacúolos ao redor do núcleo; notam-se tonofilamentos e detritos celulares agregados próximos à membrana citoplasmática (CASAS-CORDERO et al., 1981; FU & REAGAN, 1989).

3.5.3. Imuno-histoquímica

Detecta proteínas estruturais do capsídeo viral. Os papilomavírus apresentam um antígeno grupo-específico provavelmente relacionado com a proteína interna do capsídeo viral, codificada pela região L1, que pode ser detectado pela coloração de imunoperoxidase (IMPX) (SINGER et al., 1985; ROMAN & FIFE, 1989; SMOTKIN, 1989; KURMAN et al., 1992a, 1992b).

O papilomavírus bovino tipo 1, que pode ser cultivado em culturas de tecido, possui propriedades antigénicas comuns aos HPV (SYRJÄNEN et al., 1987). Assim, houve o desenvolvimento de um amplo espectro de anticorpos que podem ser usados para documentar a presença de proteínas do capsídeo viral grupo-específico em esfregaços e biópsias (CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; FU & REAGAN, 1989; REID & GREENBERG, 1991).

São detectados especificamente nos núcleos das células das camadas mais superficiais do epitélio, mais frequentemente nos coilócitos, associados com epitélios maduros bem diferenciados. (SINGER et al., 1985; CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; FU & REAGAN, 1989; ROMAN & FIFE, 1989).

Entretanto, esta técnica é pouco sensível quando comparada à técnica de hibridização devido à necessidade de haver infecção produtiva, isto é, presença da expressão do gene tardio (L) para a produção de proteínas estruturais virais, e/ou "reunião" de vírus maduros, para que o sistema de detecção funcione; isto é determinado pela diferenciação escamosa terminal do epitélio (CRUM et al., 1982; SINGER et al., 1985; SATO et al., 1986; CRUM, 1987; FU & REAGAN, 1989; NOFFSINGER et al., 1992). Além disso, a intensidade da coloração é proporcional ao número de vírus maduros presentes no núcleo da célula (SATO et al., 1986; KLUZAK & KRAUS, 1987), sendo necessárias pelo menos 200 cópias virais por núcleo para poder ser visualizado através deste método (KURMAN et al., 1992b).

Além da baixa sensibilidade do método, ele também não é tipo ou espécie-específico, detectando um antígeno que está presente em todos os diferentes tipos de papilomavírus (WOODRUFF et al., 1980; KLUZAK & KRAUS, 1987; SCHNEIDER, 1989; NOFFSINGER et al., 1992).

Sua sensibilidade é semelhante à da microscopia eletrônica (SYRJÄNEN et al., 1987).

A vantagem desta técnica é de ter tornado possível a detecção de partículas virais maduras em material fixado rotineiramente e processado em parafina, ajudando a estabelecer a íntima relação entre expressão gênica tardia, maturação celular e coilocitose, pois mantém a morfologia celular (KLUZAK & KRAUS, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987).

O índice de positividade para os antígenos do capsídeo viral em VIN III é variável entre os autores. Na maioria dos estudos, a positividade varia de 0% a 10% dos casos (CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; HUSSEINZADEH et al., 1989; PRAT, 1991), em contraste com pelo menos 50% em média dos condilomas vulvares (KLUZAK & KRAUS, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; FU & REAGAN, 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989; PRAT, 1991). Entretanto, tem sido referida na literatura a detecção de antígenos do capsídeo em até 64% dos VIN III (CRUM, 1987; GUPTA et al., 1987; SYRJÄNEN et al., 1987).

No VIN, a coloração é extremamente focal, e usualmente ocorre em áreas com atipias coilocitóticas, maturação e paraceratose (WOODRUFF et al., 1980; CRUM et al., 1982; KIMURA & MASUDA, 1985; CRUM, 1987; GUPTA et al., 1987).

Nos condilomas, talvez a baixa positividade do teste seja secundária a: expressão periódica das proteínas virais, baixa sensibilidade da coloração imuno-histoquímica para a detecção do HPV; caráter focal da positividade e qualidade

do espécime a ser testado (fixação do tecido, alterações no processamento do tecido, presença de elementos necróticos ou degenerados) (HSU, RAINE, FANGER, 1981; KURMAN et al., 1981; FALINI & TAYLOR, 1983; ROMAN & FIFE, 1989; FENOGLIO-PREISER, LISTROM, BLUME, 1992). Além disso, também podem influenciar a positividade, o tempo de infecção, o tratamento anterior e a imunidade do hospedeiro (FU & REAGAN, 1989; KURMAN et al., 1992b).

Deve ser lembrado que embora a positividade geralmente esteja presente nos núcleos das células coilocitóticas, o antígeno do capsídeo nem sempre é detectável em todos os coilocitos da lesão (KURMAN et al., 1981; CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; NOFFSINGER et al., 1992), isto é, células adjacentes, com a mesma alteração morfológica podem ser negativas. Quanto maior o número de biópsias analisadas, maior o índice de positividade (KURMAN et al., 1981; SYRJÄNEN et al., 1987).

3.5.4. Hibridização do DNA

Detecta a presença de seqüências de DNA ou RNA do HPV.

O descobrimento, isolamento e subclassificação de diferentes tipos e subtipos de HPV só se tornou possível através da hibridização, resolvendo muitas questões concernentes à relação entre HPV e diferentes formas de lesões precursoras do câncer genital (HOWLEY, 1982; KOUTSKY et al., 1988; BROWN & FIFE, 1990; NAIR & PILLAI, 1992). Estudos recentes mostram que tipos de HPV freqüentemente encontrados na região anogenital possuem diferentes potenciais oncogênicos e que tipos específicos podem servir como marcadores de neoplasia, ou seja, identificam lesões de alto risco para evoluir

para neoplasia (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1990; REID & GREENBERG, 1991; SEDLACEK et al., 1991; SYRJÄNEN, 1992).

O método da hibridização é baseado no fato de que fragmentos de DNA ou RNA de uma fita única, unem-se (hibridizam) através de pontes de hidrogênio, com seqüências de DNA ou RNA celular complementares a ela, formando híbridos estáveis, sob condições apropriadas de temperatura, pH e concentração iônica (COGHLAN et al., 1985; HÖFLER, 1987; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989; KURMAN et al., 1992a). A construção das chamadas sondas de DNA, com seqüências conhecidas de nucleotídeos de determinado tipo viral permitiu a caracterização do DNA viral existente nos diferentes tecidos. Através da hibridização existe a ligação do DNA conhecido da sonda marcada com o seu homólogo no tecido, identificando-o (KLUZAK & KRAUS, 1987).

Vários são os métodos de hibridização, entre eles: hibridização "in situ", e as hibridizações em filtro como o "Southern blot, Northern blot, dot blot", e mais recentemente, a reação de polimerização em cadeia (PCR) (CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989).

As sondas empregadas podem ser de DNA, RNA ou oligonucleotídeos normalmente marcados com material radioativo ou ligados a substâncias químicas, como a biotina. (SYRJÄNEN et al., 1987; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989; CLAVEL et al., 1991).

As sondas de RNA são mais sensíveis que as de DNA, devido a ausência de "renaturação", e presença de uma maior quantidade de RNA mensageiro por célula em relação ao DNA (HÖFLER, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989).

Em relação às substâncias marcadoras das sondas, a maioria dos autores consideram que as radioativas são mais sensíveis que as biotiniladas (HÖFLER, 1987; NAGAI et al., 1987; NUOVO & RICHART, 1989a; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989; SYRJÄNEN, 1990). Entretanto, alguns as consideram como tendo sensibilidade semelhante (NUOVO & RICHART, 1989a; SEYDA et al., 1989; CLAVEL et al., 1991). Embora as sondas radioativas sejam altamente sensíveis, entre suas desvantagens estão: trabalho com material radioativo requerendo equipamento especial e treinamento do pessoal para o seu manuseio, menor estabilidade, problemas de detecção como fundo, grande tempo de exposição com demora na visualização do resultado e melhores resultados em material não fixado. Quanto às sondas ligadas à biotina, são mais estáveis, não radioativas, implicam menor custo, tempo de detecção mais rápido e mais fácil manuseio, possuindo alta resolução, embora sejam menos sensíveis (HÖFLER, 1987; NUOVO & RICHART, 1989a; ROMAN & FIFE, 1989; CLAVEL et al., 1991).

A **hibridização "in situ"** (HIS) foi introduzida em 1969 (HÖFLER, 1987) e permite a simultânea identificação e localização do DNA ou RNA viral em preparações citológicas ou histológicas, fixadas ou congeladas, ao nível de uma célula isolada, preservando a morfologia celular e a arquitetura do tecido durante o processamento; além disso é o método de escolha para estudos retrospectivos empregando material fixado em formol e mantido em parafina (McDOUGALL, MYERSON, BECKMANN, 1986; SYRJÄNEN et al., 1987; KOUTSKY et al., 1988; ROMAN & FIFE, 1989; WRIGHT & RICHART, 1990). Esta técnica permite a investigação da dinâmica da replicação do HPV e sua expressão gênica, correlacionando-a com a diferenciação celular e transformação neoplásica (STOLER & BROKER, 1986); permite a associação entre a morfologia e os diferentes tipos de HPV; informa a expressão gênica em diferentes células da lesão e identifica a presença do DNA de diferentes tipos de

HPV numa mesma célula ou em células distintas de uma mesma lesão (SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989).

A reação de positividade da HIS pode ser evidenciada em toda a espessura do epitélio, sendo que a intensidade da coloração aumenta progressivamente das camadas mais profundas até a superfície, a qual apresenta um maior conteúdo de DNA viral devido ao alto índice de replicação do HPV nas camadas mais superficiais (McDOUGALL et al., 1986; SCHNEIDER et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; NOFTSINGER et al., 1992; SYRJÄNEN, 1992). A intensidade da coloração também depende do grau de maturação do epitélio (CRUM et al., 1982; STOLER & BROKER, 1986; BECKMAN et al., 1988; NUOVO & RICHART, 1989b; SCHNEIDER et al., 1991) e do número de cópias virais, e ainda, sua distribuição é variável numa mesma lesão, e em lesões diferentes de um mesmo paciente (STOLER & BROKER, 1986; SCHNEIDER et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989).

Deve ser lembrado que a reação da HIS pode ser positiva em epitélio clínico e histologicamente normais, e negativa em células coilocitóticas (McCANCE et al., 1985; CRUM, 1987; ROMAN & FIFE, 1989; NUOVO, 1990).

A técnica da hibridização "in situ" expõe-se a ser prejudicada pela variação da fixação e preparo do tecido com alteração da preservação do DNA, dificultando o acesso da sonda aos ácidos nucleicos celulares durante a hibridização. A atividade específica da sonda e a sensibilidade do sistema de detecção também são fatores limitantes (McDOUGALL et al., 1986; CRUM, 1987).

Outro método de hibridização é o **Southern blot**, descrito em 1975 por ¹²E.M. SOUTHERN, mais específico e mais sensível que a hibridização "in situ" (CRUM, 1987; KLUZAK & KRAUS, 1987; NAGAI et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; SYRJÄNEN, 1990). Através dele permite-se medir o tamanho do DNA, subclassificar a sua fragmentação, identificar novos tipos e subtipos de vírus na forma extracromossômica ou integrada, e facilmente distinguí-las de reação cruzada (CRUM, 1987; KOUTSKY et al., 1988; ROMAN & FIFE, 1989; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989; SYRJÄNEN, 1990). Além disso, pode-se detectar pequenas quantidades de vírus, equivalentes a 0,1 a 0,01 cópias do genoma viral por célula (CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989), enquanto a hibridização "in situ" requer cerca de 200 a 800 cópias por célula na técnica biotinilada (CRUM, 1987; GUPTA et al., 1987; DUGGAN et al., 1989; ROMAN & FIFE, 1989) e 20 a 100 nas radioativas (GUPTA et al., 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; ROMAN & FIFE, 1989; YUN, MOLENAAR, WILKINS, 1989; SCHNEIDER et al., 1991).

Também é mais fácil de ser padronizado, não sendo sujeito à variabilidade da fixação ou preparação do tecido, pois utiliza o material não fixado (CRUM, 1987). Entretanto, requer grande quantidade de tecido fresco, consome muito tempo, é trabalhoso, e necessita de equipamento especial, pois utiliza sondas radioativas (STOLER & BROKER, 1986; KLUZAK & KRAUS, 1987; NUOVO & RICHART, 1989a; ROMAN & FIFE, 1989; HIGGS et al., 1990); ainda, há perda da morfologia, não se podendo localizar a positividade celular dentro da lesão porque é utilizado o homogeinizado do tecido (STOLER & BROKER, 1986; ROMAN & FIFE, 1989).

¹² SOUTHERN, E.M. apud KLUZAK, T.R. & KRAUS, F.T. - Condylomata, papillomas, and verrucous carcinomas of the vulva and vagina. In: WILKINSON, E.J. ed. - **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 49-77 (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).

A **reação de polimerização em cadeia** (PCR), é o método mais sensível disponível atualmente para a detecção do DNA do HPV (SYRJÄNEN, 1990; KURMAN et al., 1992a). É uma técnica enzimática que permite a amplificação de seqüências específicas do DNA alvo no espécime a ser estudado, através da incubação sucessiva e repetida a temperaturas que causem a desnaturação do DNA, associação com seqüências de oligonucleotídeos ("primers") e síntese de DNA (KOUTSKY et al., 1988; SCHNEIDER & GRUBERT, 1989; BROWN & FIFE, 1990; SYRJÄNEN, 1990; KURMAN et al., 1992a). Com este método é possível obter uma amplificação do DNA alvo de no mínimo um milhão de vezes (KURMAN et al., 1992a.), e se consegue detectar uma cópia do genoma do HPV em 10^5 a 10^6 células (ROMAN & FIFE, 1989; BROWN & FIFE, 1990; BRANDENBERGER et al., 1992) pode ser usado em material a fresco ou tecidos fixados (KIYABU et al., 1989; SCHNEIDER & GRUBERT 1989; KURMAN et al., 1992a), porém não permite a localização topográfica da reação positiva (KIYABU et al., 1989; KURMAN et al., 1992a.).

Por ser muito sensível, está sujeita a dificuldades pela contaminação inadvertida (ROMAN & FIFE, 1989; NOFTSINGER et al., 1992), ou seja, além da amplificação do DNA alvo, os contaminantes também são amplificados e podem levar a erros de interpretação.

No geral, os métodos de hibridização consomem muito tempo e são muito dispendiosos para o diagnóstico de rotina, sendo a hibridização "in situ" o mais simples, rápido e adequado ao morfologista.

As evidências mais substanciais da relação entre HPV e carcinogênese, principalmente do trato anogenital, e mais notadamente no colo uterino, vêm da hibridização molecular.

Considerando as diferentes técnicas de hibridização, e levando-se em conta os diferentes graus de sensibilidade do método, tem-se detectado o DNA do

HPV em cerca de 90% dos condilomas (SINGER et al., 1985; WILBUR, REICHMAN, STOLER, 1988; FU & REAGAN, 1989; AMORTEGUI et al., 1990), e em 80% das neoplasias intraepiteliais e invasivas do colo uterino (STOLER & BROKER, 1986; FU & REAGAN, 1989; ROMAN & FIFE, 1989; NUOVO et al., 1991; SCHNEIDER et al., 1991) . Na região vulvar, o índice de detecção é menor em relação ao colo uterino (NUOVO et al., 1991) sendo a média da positividade de 60% através da HIS nas neoplasias intraepiteliais vulvares, e em 36% dos carcinomas invasivos da vulva (ZUR HAUSEN, 1986; NUOVO et al., 1991; PARK et al., 1991a; RUSK et al., 1991; SCHNEIDER et al., 1991; TOKI et al., 1991; KURMAN et al., 1992a).

Os tipos 6 e 11 do HPV estão mais frequentemente relacionados com lesões benignas diplóides ou poliplóides e são tipicamente encontrados nas verrugas genitais clássicas sem um significativo grau de atipia nuclear; entretanto eles também têm sido identificados em raros casos (menos de 10%) de neoplasia intraepitelial e invasora da vulva (SYRJÄNEN et al., 1987; ZUR HAUSEN, 1987; TWIGGS et al., 1988; SMOTKIN, 1989; BROWN & FIFE, 1990; RUSK et al., 1991; KURMAN et al., 1992b; SYRJÄNEN, 1992). Cerca de 65% a 93% dos condilomas apresentam o tipo 6 do HPV e 21% o tipo 11 (KLUZAK & KRAUS, 1987).

Os tipos 16, 18, 31, 33, 35 e 39 estão mais associados com lesões epiteliais precursoras aneuplóides e lesões invasoras do trato genital feminino baixo, incluindo o adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso (CRUM, 1987; REID et al., 1987; BARNES et al., 1988; BUSCEMA et al., 1988; SMOTKIN, 1989; KURMAN et al., 1992a). O tipo mais comumente encontrado é o 16, estando presente em cerca de 80% das neoplasias intraepiteliais vulvares (SINGER et al., 1985; CRUM, 1987; REID et al., 1987; HØRDING et al., 1991; KURMAN et al., 1992a; MITCHELL et al., 1993), e cervicais (SINGER et al., 1985; REID et al., 1987; FRANQUEMONT et al., 1989; NAIR & PILLAI,

1992), 45% dos carcinomas invasivos da vulva (SINGER et al., 1985; REID et al., 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; HØRDING et al., 1991; KURMAN et al., 1992a; MITCHELL et al., 1993) e em 80% dos carcinomas do colo uterino (SINGER et al., 1985; CRUM, 1987; REID et al., 1987; GISSMANN, 1989; KIYABU et al., 1989; KURMAN et al., 1992a; NAIR & PILLAI, 1992).

A tentativa de se correlacionar o tipo de HPV com a histopatologia não tem sido bem sucedida devido a três aspectos observados (CRUM, 1987):

- 1) Cerca de 5% a 30% dos casos apresentam infecção por mais de um tipo de HPV em uma mesma lesão (CRUM, 1987; GUPTA et al., 1987; REID et al., 1987; PILOTTI et al., 1989; BECKMANN et al., 1991).
- 2) Alguns pacientes possuem múltiplas lesões de diferentes aspectos clínico-histológicos (desde condiloma até neoplasia intraepitelial) contendo o HPV 16 (CRUM, 1987)
- 3) Tipos virais considerados como de baixo risco, isto é, o 6 e 11, têm sido isolados de lesões intraepiteliais e invasivas do trato anogenital (SYRJÄNEN et al., 1987; WELLS et al., 1987; ZUR HAUSEN, 1987; BROWN & FIFE, 1990; RUSK et al., 1991), assim como os de alto risco, como os tipos 16 e 18, podem também ser identificados em lesões condilomatosas benignas (SINGER & McCANCE, 1985; BUSCEMA et al., 1988).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Seleção das amostras

Através da revisão dos arquivos de patologia cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, no período de janeiro de 1983 a maio de 1992, foram levantados os casos de neoplasia intraepitelial vulvar grau III (30 casos) e de carcinoma escamoso estágio Ia da vulva (seis casos).

As características clínicas das lesões, sinais, sintomas e idade das pacientes, foram registradas a partir dos dados da requisição.

Todo o material examinado havia sido enviado a este serviço fixado em formalina a 10% e submetido aos procedimentos habituais para inclusão em parafina.

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram examinadas, revistos os critérios diagnósticos de acordo com as definições de VIN III e estágio Ia para carcinoma vulvar preconizadas pela Sociedade Internacional para o Estudo das Doenças Vulvares (WILKINSON et al., 1986).

Os critérios para o diagnóstico de invasão utilizados foram (WILKINSON, 1987; KURMAN et al., 1992b):

- infiltrado inflamatório, fibrose ou edema, proeminente no ponto de invasão,

- perda do arranjo em paliçada das células epiteliais ao nível da junção dermo-epidérmica com crescimento epitelial desordenado,
- células escamosas isoladas se estendendo ao estroma subjacente,
- aumento da eosinofilia citoplasmática das células invasoras.

Foram selecionados os melhores blocos para o processamento das reações de imunoperoxidase e hibridização "in situ", levando-se em conta o tamanho do espécime, a presença de alterações morfológicas sugestivas de infecção viral e de áreas histologicamente normais. Os mesmos blocos utilizados para o exame imuno-histoquímico foram também submetidos à hibridização "in situ". Estas técnicas especiais foram repetidas até se conseguir um resultado considerado satisfatório, ou até o desbastamento total do bloco.

Estes estudos específicos, da IMPX e IIS, foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM/FCM/UNICAMP, de acordo com os seguintes procedimentos:

4.2. Imunoperoxidase

A pesquisa do antígeno comum do capsídeo do papilomavírus humano foi realizada segundo os procedimentos habituais de imuno-histoquímica como descrito por HSU et al. (1981).

A variante utilizada para a revelação do anticorpo primário ligado ao antígeno foi o método da Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) (Kit Vector, PK 4001) (HSU et al., 1981; FALINI & TAYLOR, 1983).

A reação de imunoperoxidase permite a localização de antígenos celulares em continuação com um anticorpo específico, via enzima peroxidase. Uma substância geradora de cor (cromógeno) contendo peróxido de hidrogênio é adicionada para reagir com a enzima peroxidase e precipita no local onde o antígeno está presente. A quantidade do cromógeno precipitado, e portanto a intensidade da reação, é proporcional a quantidade de antígeno presente nas células. As células contendo antígeno e os outros componentes do tecido analisados, serão contrastados pela contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

São utilizados três reagentes (HSU et al., 1981; FALINI & TAYLOR, 1983) (Figura 3):

- anticorpo primário (específico para o antígeno a ser localizado),
- anticorpo secundário capaz de ligar-se ao primário, conjugado à biotina,
- complexo de peroxidase conjugado à avidina e biotina.

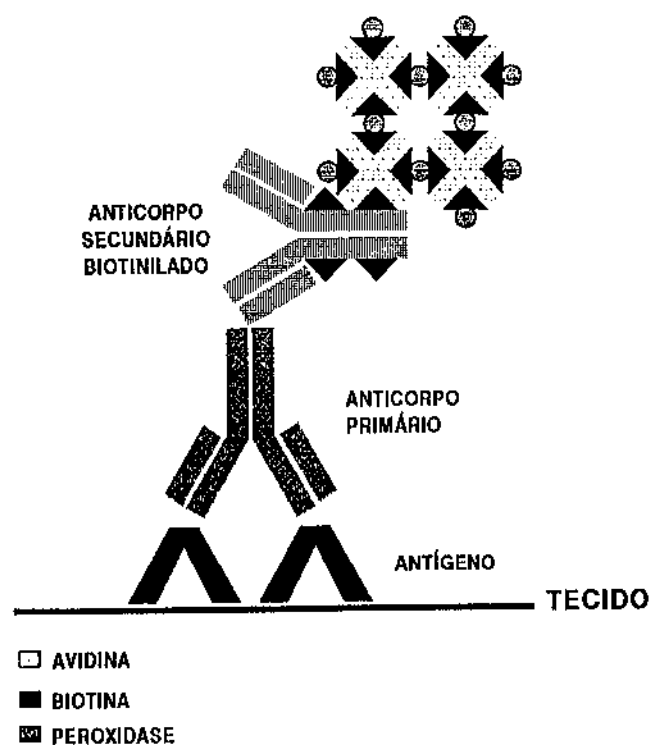


FIGURA 3 - Técnica da imunoperoxidase através do método da avidina - biotina - peroxidase (ABC)

Sumariamente, procedeu-se como se segue:

- **cortes histológicos** de cinco micrômetros foram colocados em lâminas lavadas, desengorduradas e tratadas com solução aquosa de cola branca escolar comum (cola Tenaz, diluição 1:20), para melhor adesão dos fragmentos;
- **incubação** das lâminas com os cortes por cerca de 24 horas em estufa a 65°C, para melhor adesão dos mesmos;
- **desparafinização** dos cortes, com um banho de xilol a 60°C por 15 minutos, e dois banhos de xilol a temperatura ambiente, dez minutos cada;

- **hidratação** em gradiente decrescente de álcoois: três banhos em álcool absoluto, dez minutos cada; um vez em álcool 80%, cinco minutos; um vez em álcool 50%, cinco minutos; todos a temperatura ambiente;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos e passagem por água destilada;
- **inibição da peroxidase endógena**: banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio 30% em metanol, 15 minutos, a temperatura ambiente;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos, passagem por água destilada e tampão PBS (tampão salino-fosfato, pH 7,6);
- **inibição dos antígenos inespecíficos**: incubação com soro normal de cabra policlonal (soro não imune, diluição 1:60, Kit Vector, PK 4001), 20 minutos, a temperatura ambiente;
- **retirado o excesso de soro normal**, sem lavagem posterior;
- **reação antígeno-anticorpo primário**: incubação com anticorpo primário de coelho anti-papilomavírus (policlonal, diluição 1:50, Dakopatts-Denmark), durante a noite a 4°C (geladeira), em câmara úmida;
- **retirado o excesso de anticorpo primário**: três lavagens em tampão PBS (pH 7, 6), cinco minutos cada, em temperatura ambiente;
- **reação com o anticorpo secundário biotinilado**: incubação com anticorpo secundário biotinilado de cabra, anti-coelho (policlonal, diluição 1:200, Kit Vector, PK 4001), 30 minutos, a temperatura ambiente, em câmara úmida;

- **retirado o excesso de anticorpo secundário:** três lavagens em tampão PBS (pH 7, 6), cinco minutos cada, a temperatura ambiente;
- **reação com ABC:** incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (diluição 1:100, Kit Vector, PK 4001), 30 minutos, a temperatura ambiente, em câmara úmida. Este complexo se liga ao anticorpo secundário biotinilado através da avidina;
- **retirado o excesso do complexo avidina-biotina-peroxidase:** 3 lavagens em tampão PBS (pH 7, 6), cinco minutos cada, a temperatura ambiente;
- **coloração** (revelação do substrato - cromógeno): realizada com DAB (3, 3-tetrahidrocloro de diaminobenzidina, Sigma, D 5637), 40 miligramas, preparado em 100 mililitros de tampão PBS (pH 7, 6) e 20 microlitros de peróxido de hidrogênio a 30%. As lâminas foram deixadas nesta solução por cerca de dois minutos a temperatura ambiente, ou até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos;
- **contra-coloração** da amostra com hematoxilina de Mayer por um minuto;
- **lavagem** em água corrente por dois minutos;
- **desidratação** em gradiente crescente de álcoois;
- **passagem** em três xilóis;
- **montagem** das lamínulas com resina Entellan (Merck, 7961).

Foram utilizados controles positivos e negativos, para melhor confiabilidade dos resultados.

A observação dos resultados foi realizada em microscópio óptico comum, sendo considerados positivos os casos que apresentaram pelo menos um núcleo fortemente corado, de coloração acastanhada, em contraste com os azulados negativos corados pela hematoxilina.

4.3. Hibridização "in situ" (NAGAI et al., 1987)

Com esta técnica é possível determinar o tipo específico de HPV presente no tecido.

As sondas de sequência conhecida são ligadas a uma substância que permitirá a visualização da reação.

São utilizadas sondas de DNA específicas para certos tipos de HPV, marcadas com biotina. As sondas podem ser aplicadas em cortes histológicos e a visualização da reação se faz pela revelação da biotina ligada à sonda, a qual se une ao complexo avidina-biotina-peroxidase, a exemplo do que ocorre com o método da imunoperoxidase (Figura 4). Este complexo é visualizado após a conversão do substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio e 3-amino-9-etilcarbazol) para um precipitado vermelho.

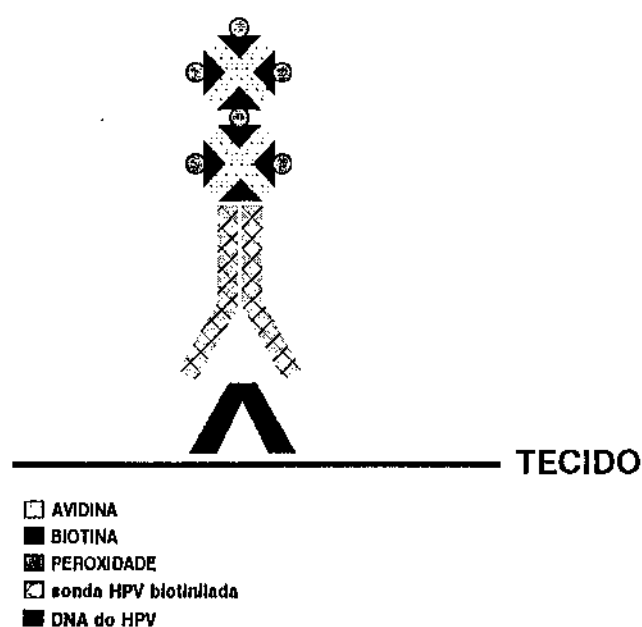


FIGURA 4 - Método da hibridização "in situ" utilizando-se sondas de DNA de sequência conhecida, marcadas com biotina.

Dispomos atualmente de "Kits" comerciais para a pesquisa do HPV. Utilizamos neste estudo, o "Kit" PathoGene, Enzo Diagnostics, Inc, New York (32877A e 32877B), contendo sondas para os HPV tipos: 6/11, 16/18 e 31/35/51, cujo procedimento é padronizado pelo fabricante e resumimos a seguir:

a) Preparação das lâminas de tecido

- **Cortes histológicos** de cinco micrômetros foram colocados em lâminas previamente tratadas com substância adesiva, que constam no "Kit". Com a necessidade de repetir a reação em alguns casos, preparamos outras lâminas com organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silane, Sigma, A 3648, USA), que permite maior adesividade dos fragmentos, pois na técnica de hibridização os tratamentos intensivos dos cortes podem levar ao seu descolamento;

- **incubação das lâminas** por pelo menos uma hora em estufa a 60°C para intensificar a adesão;
- **Desaparafinação** dos cortes em um banho de dez minutos com xilol e outro de dois minutos;
- **hidratação** dos tecidos em gradiente decrescente de álcoois (duas vezes em álcool absoluto, e uma vez em álcool 90%, 70% e 50%, um minuto cada);
- **incubação** em água destilada e deionizada por um minuto;
- **secagem** das lâminas em estufa a 37°C por cinco minutos;
- **digestão enzimática** das proteínas com solução recém-preparada de proteinase K (remoção das proteínas associadas aos ácidos nucleicos, para tornar o DNA do espécime acessível às sondas). Incubação das lâminas por 15 minutos em estufa a 37°C;
- **lavagem** com tampão recém-preparado (fornecido pelo fabricante), três lavagens, um minuto cada;
- **incubação com reagente bloqueador:** 0,5 mililitro, por dez minutos a 37°C (para eliminar a atividade da peroxidase endógena);
- **lavagem** com tampão, dez segundos, com piceta; água deionizada, um minuto;
- **desidratação** dos tecidos em gradiente crescente de álcoois (álcool 50%, 70% e absoluto), um minuto cada;
- **secagem** das lâminas a 37°C ou à temperatura ambiente. Neste passo, as lâminas foram guardadas durante a noite.

b) Procedimento de hibridização e coloração

- **aplicação das sondas** de DNA do HPV dos tipos: 6/11, 16/18 e 31/35/51, marcadas com biotina, em cada lâmina;
- **cobertura** com lamínula;
- **desnaturação** do DNA alvo e da sonda: as lâminas foram colocadas sobre placa aquecida a $92 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por dez minutos;
- **hibridização**: as lâminas foram retiradas da placa aquecida a 92°C e colocadas em estufa a 37°C , por 30 minutos;
- **retirada** das lamínulas com pinça e tampão;
- **aplicação da solução pós-hibridização**: 0,5 mililitro em cada lâmina, e incubação em estufa a 37°C por dez minutos;
- **retirada do excesso** da solução pós-hibridização;
- **lavagem** três vezes em tampão;
- **retirado o excesso** de tampão;
- **aplicação do complexo de detecção**: 0,5 mililitro em cada lâmina, e incubação a 37°C , por 15 minutos, em estufa;
- **lavagem** de cada lâmina com tampão por dez segundos com piceta, e três banhos de tampão;
- **retirado o excesso** de tampão;
- **secagem** das lâminas;

- **aplicação do reagente substrato-cromógeno:** 0,5 mililitro em cada lâmina, preparado conforme especificação do fabricante. Incubação em estufa a 37°C por 15 minutos;
- **repetição** da lavagem com tampão e secagem das lâminas;
- **contra-coloração** com hematoxilina de Mayer;
- **lavagem** com água amoniacal;
- **montagem** em glicergel.

Foram utilizados controles positivos e negativos, fornecidos pelo "Kit", para maior confiabilidade dos resultados.

A reação se processa no núcleo das células, e após a hibridização, a presença do genoma viral será detectada enzimaticamente a partir das sondas marcadas pela biotina. A revelação dos sítios de biotina através dos complexos de detecção e substrato-cromógeno, permitem a visualização de um precipitado vermelho-tijolo intranuclear, indicador da reação imunoquímica positiva.

A leitura foi realizada com microscópio de luz comum.

Foram considerados como positivos quando pelo menos um núcleo apresentava-se fortemente corado.

4.4. Análise estatística

Quando houve necessidade da utilização de análise estatística, ela foi realizada através do cálculo do qui-quadrado nas tabelas 2x2 e do teste t de "Student". O valor crítico considerado foi o de $p < 0,05$. Na presença de um resultado estatístico significativo, utilizamos a correção de Yates nos casos em

que a proporção de uma das classes fosse menor do que cinco (BEIGUELMAN, 1991).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Pacientes e exames anátomo-patológicos (Anexo)

Entre o período de janeiro de 1983 a maio de 1992, foram encontrados 36 diagnósticos histológicos correspondentes a neoplasia intraepitelial vulvar grau III ou carcinoma escamoso estágio Ia da vulva, em material de biópsia ou de vulvectomy de 29 pacientes. Em seis delas, foram realizados mais de um exame anátomo-patológico, seja por biópsia seguida de vulvectomy, ou ampliação de margem cirúrgica comprometida.

Consideramos para análise do material, o número total dos exames anátomo-patológicos, independente do número de pacientes, ou seja, 36 casos, pois encontramos em diferentes espécimes de uma mesma paciente padrões histológicos diversos relacionados a: presença ou não de sinais morfológicos de infecção viral associada, variantes histológicas diferentes de VIN, presença ou não de invasão superficial do estroma, e variada positividade dos exames de imuno-histoquímica e hibridização "in situ".

Desta forma, os 36 casos estudados estavam distribuídos em: 25 biópsias vulvares, três ressecções com margens ampliadas, duas vulvectomias parciais, três vulvectomias simples, e três radicais.

Outros quatro casos adicionais encontrados não foram incluídos pois os blocos apresentavam-se danificados.

5.2. Informações clínicas e dados do exame físico e macroscópico (Anexo)

Os dados sobre sintomas, sinais e descrições macroscópicas das lesões foram obtidos a partir das requisições do exame anatomopatológico e apresentaram-se freqüentemente incompletos.

Conseguimos coletar neste material os seguintes dados clínicos, quando presentes: prurido vulvar, lesões verrucosas genitais e alterações de hipo ou hiperpigmentação da pele. O tempo de história variou de um mês a três anos.

Os dados do exame físico e/ou macroscópico das lesões, relatados em 24 casos, revelavam mais freqüentemente:

- a) alterações cromáticas: hipo ou hiperpigmentação (16 casos);
- b) lesões exofíticas: pápulas, nódulos, vegetantes (15 casos);
- c) lesões ulceradas (quatro casos);
- d) alguns casos descritos apenas como teste de Collins positivo (dois casos).

Em dez dos 24 casos havia a associação de discromia vulvar e lesão exofítica.

A multifocalidade das lesões foi descrita clinicamente e histologicamente comprovada em 14 dos 36 casos (38,9%). Dezenove casos eram descritos clinicamente como lesão única e três não relatados.

Quanto à localização, as lesões ocorreram em ordem de freqüência em (Figura 5):

- a) pequeno e grande lábio direito;
- b) pequeno e grande lábio esquerdo;
- c) fúrcula vaginal, clitoris e períneo.

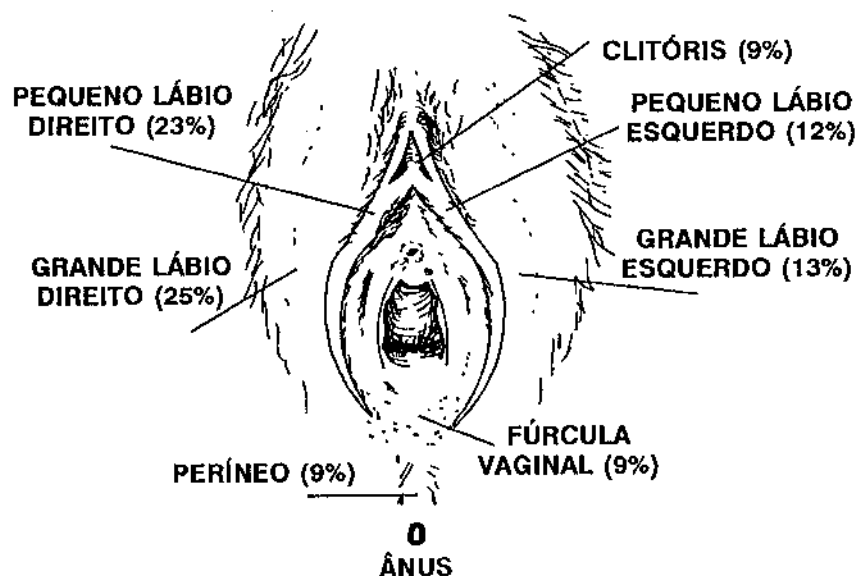


FIGURA 5 - Topografia das lesões e sua distribuição na vulva (KURMAN et al., 1992b)

5.3. Diagnósticos histológicos (Anexo)

A distribuição dos diagnósticos foi de 30 casos de VIN III e seis carcinomas estágio Ia da vulva.

O padrão histológico dos casos de VIN III correspondeu à variante bowenóide (Figuras 6 e 7) em 27 casos (90%), e apenas três casos (10%) foram classificados como do tipo simples (Figura 8).

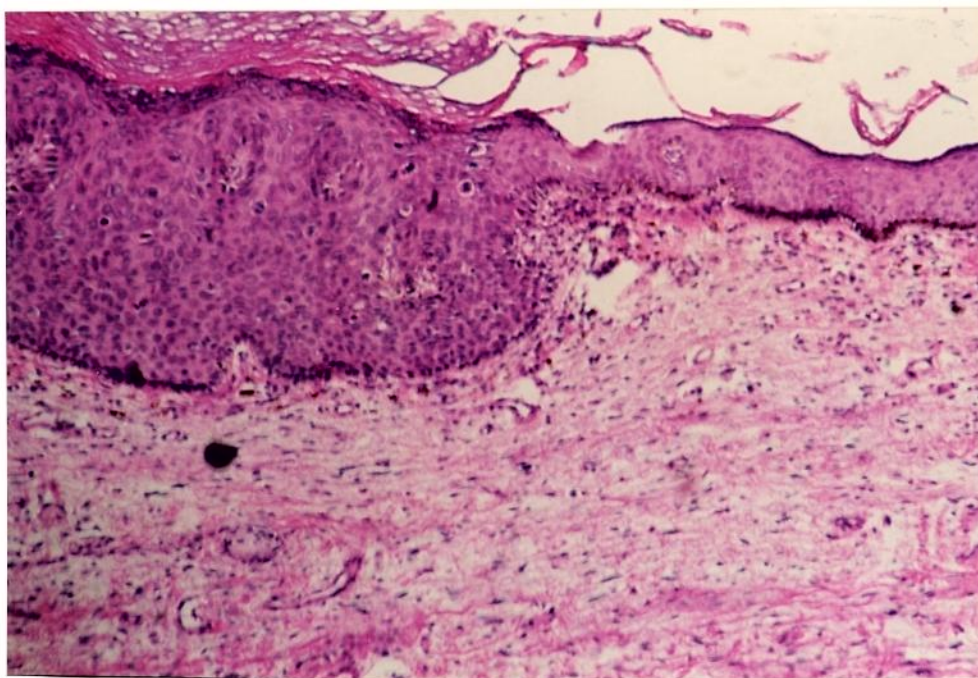


FIGURA 6 - Transição entre epitélio normal e atípico (VIN III, padrão histológico bowenóide) (HE, 83X)

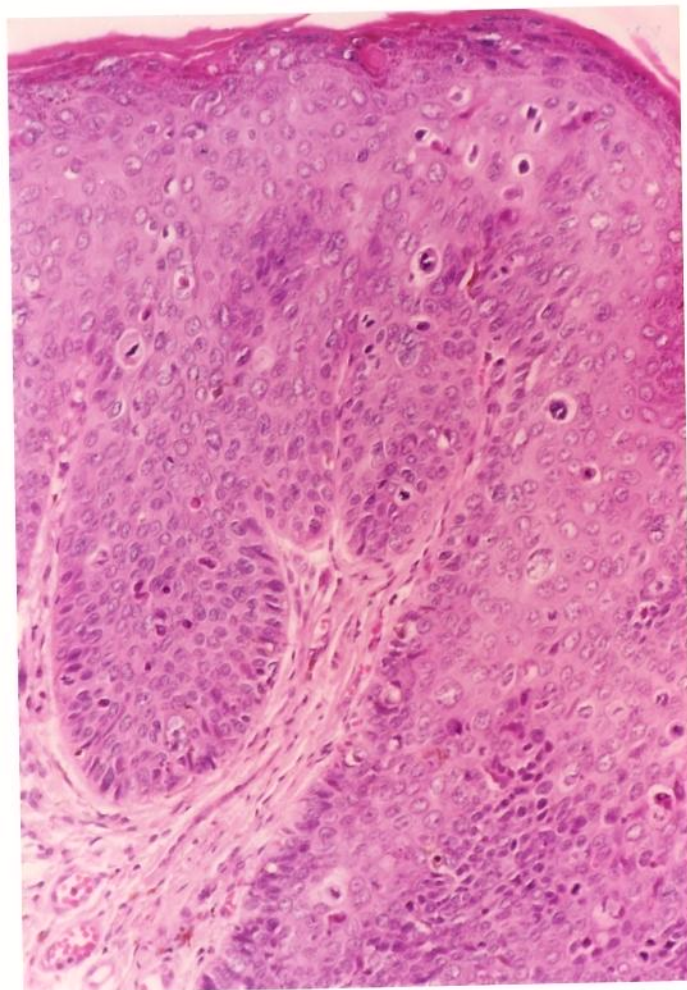


FIGURA 7 - Neoplasia intraepitelial vulvar grau III, variante histológica bowenóide (HE, 132x)

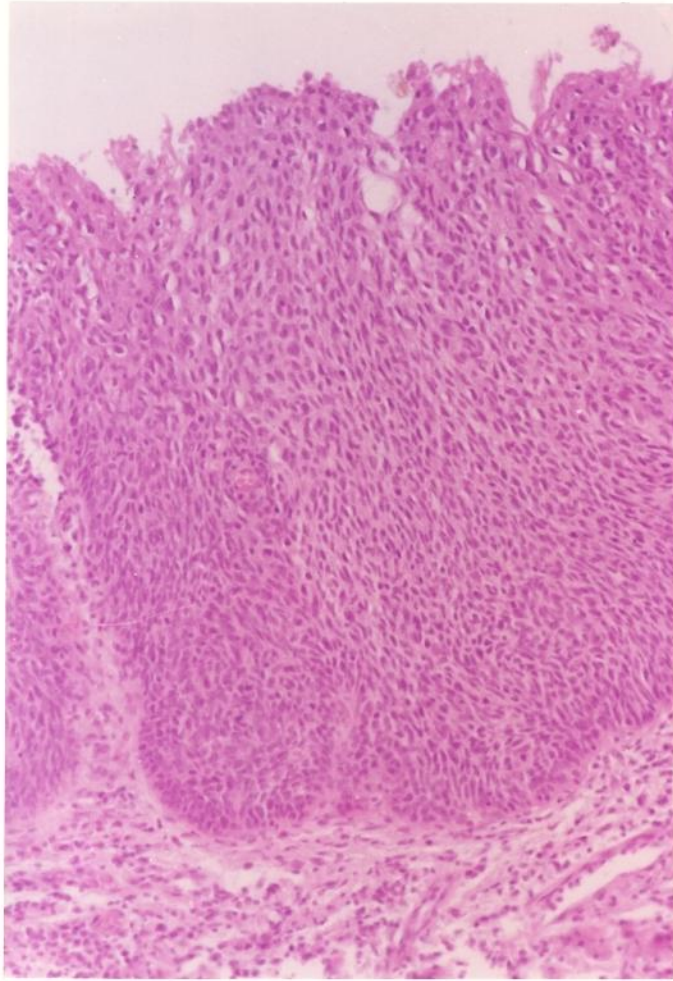


FIGURA 8 - Neoplasia intraepitelial vulvar grau III variante histológica simples, com atipia coilocitótica superficial leve e focal (HE, 132X).

Em relação aos carcinomas estágio Ia, todos os seis casos corresponderam à variante bowenóide (Figura 9), cuja profundidade máxima de invasão do estroma variou de 0,10 a 0,47 milímetros. Todos apresentavam VIN III adjacente à área de invasão. O padrão de invasão era do tipo compressivo em três casos (Figura 10), dois com aspecto infiltrativo (Figura 9) e um caso apresentava associação de ambos os padrões. Em nenhum deles houve invasão vascular. A linfadenectomia foi realizada em apenas 2 casos, porém não foram encontradas metástases ganglionares.

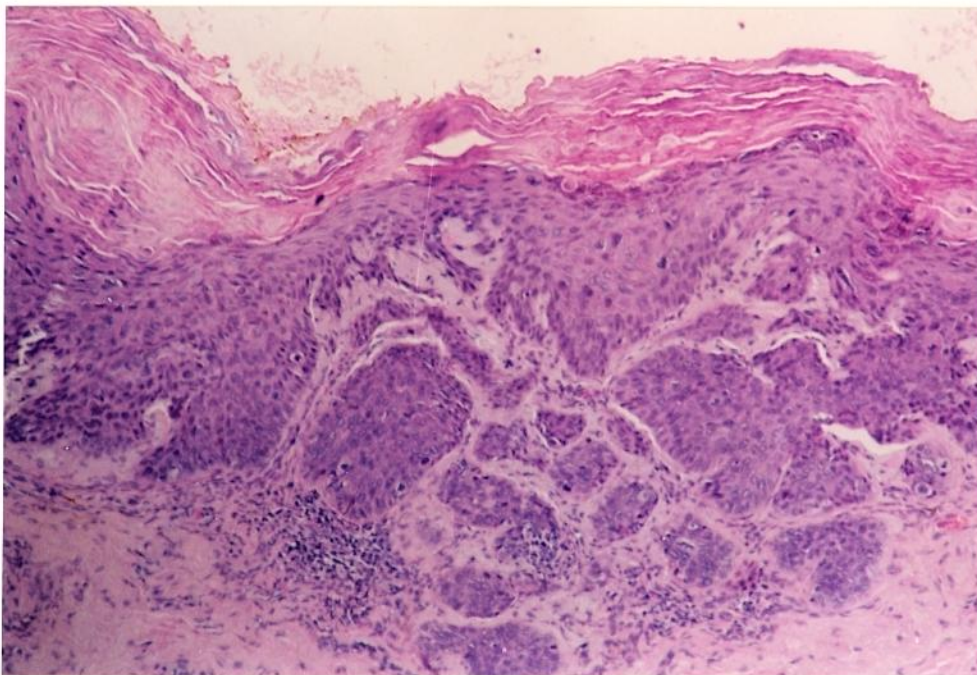


FIGURA 9 - Carcinoma escamoso da vulva estágio Ia, variante bowenóide, e padrão de invasão do tipo infiltrativo (HE, 83x)

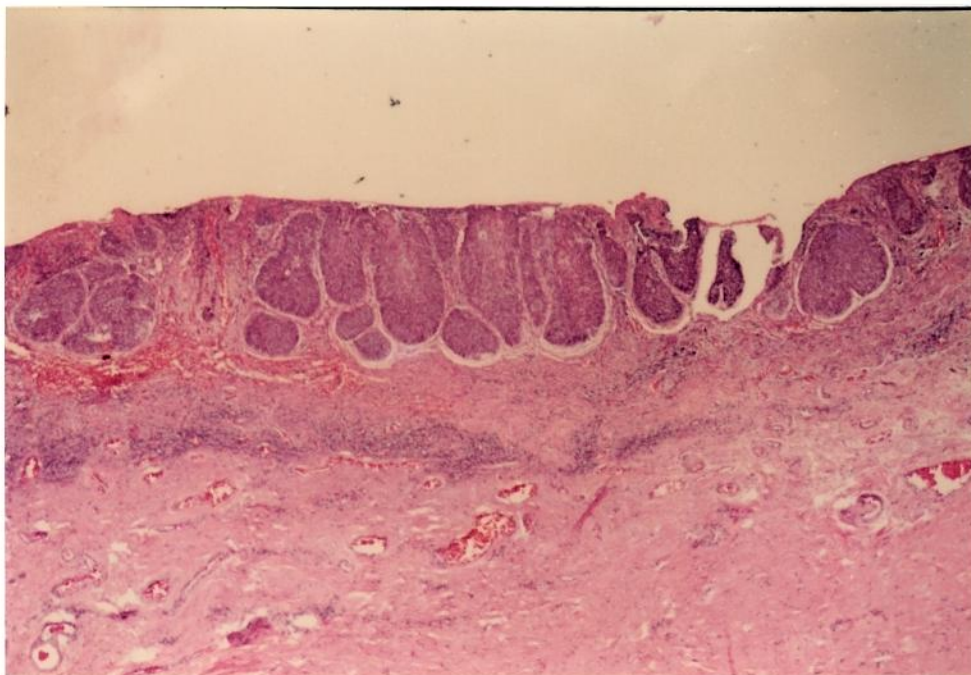


FIGURA 10 - Carcinoma escamoso da vulva estágio Ia, padrão de invasão do tipo compressivo (HE, 33x)

Quanto ao acometimento dos apêndices cutâneos pela neoplasia, foi observado que em 13 dos 23 casos (56,5%) em que os anexos estavam presentes no material estudado, houve extensão para as glândulas (Figura 11) ou folículos pilosos (Figura 12), sendo que apenas três deles eram carcinomas estágio Ia, e o restante VIN III.

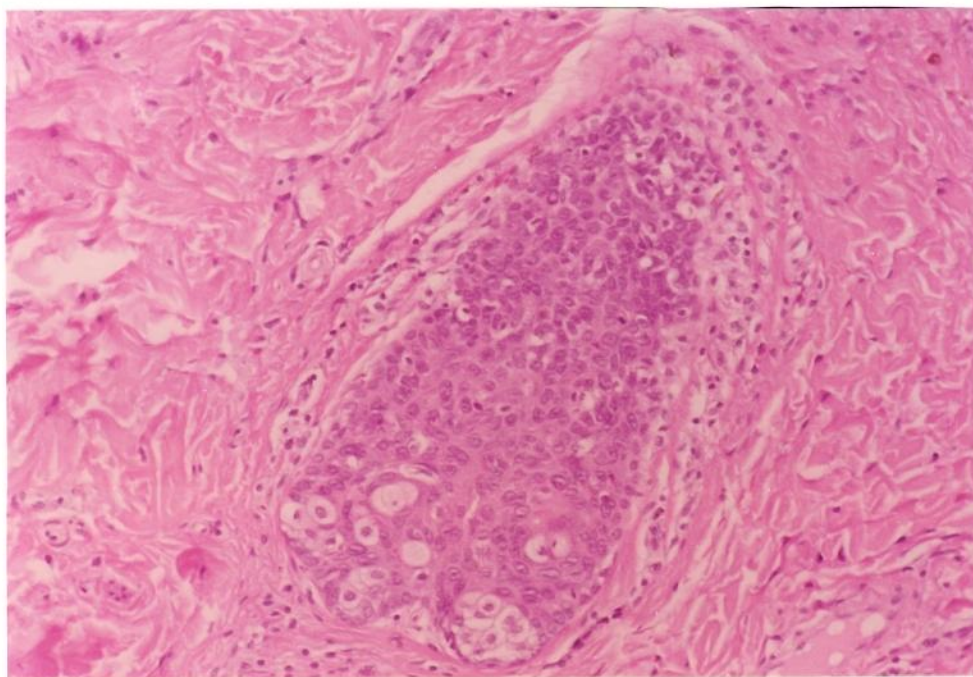


FIGURA 11 - Extensão da neoplasia (VIN III) para glândula sebácea (HE, 132x)

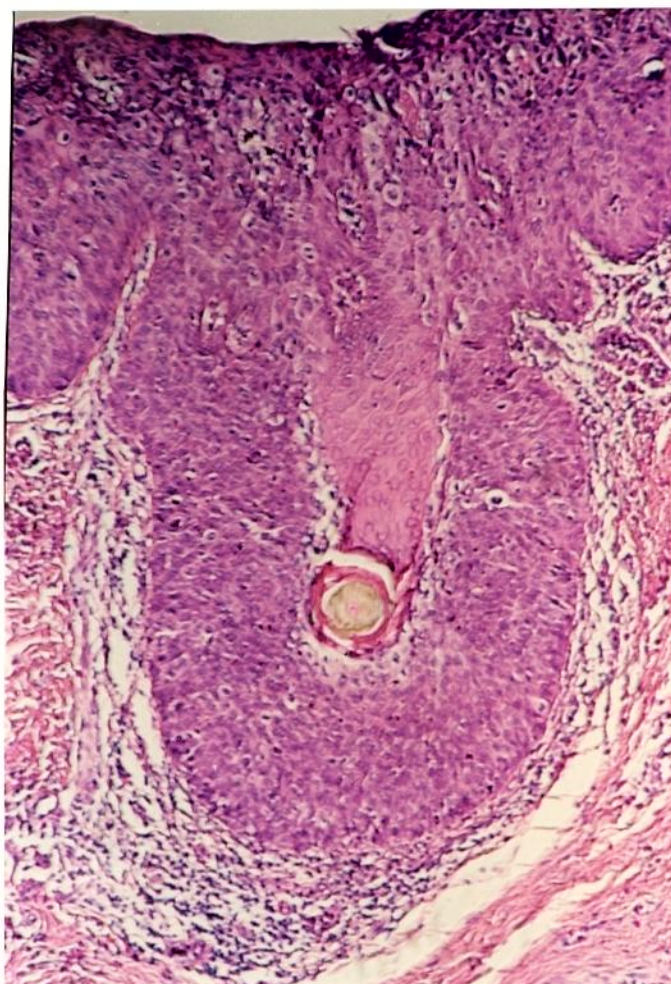


FIGURA 12 - Extensão da neoplasia (VIN III) para folículo piloso (HE, 132x)

Os sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV, isto é, atipias coilocitóticas, disceratose e binucleação, estavam presentes em 30 dos 36 casos estudados (83,3%) (Figura 8 e 13). A intensidade destas alterações era variada, desde um grau leve e focal, até o quadro exuberante e característico da lesão condilomatosa. Houve seis casos onde não foi observada a atipia coilocitótica.

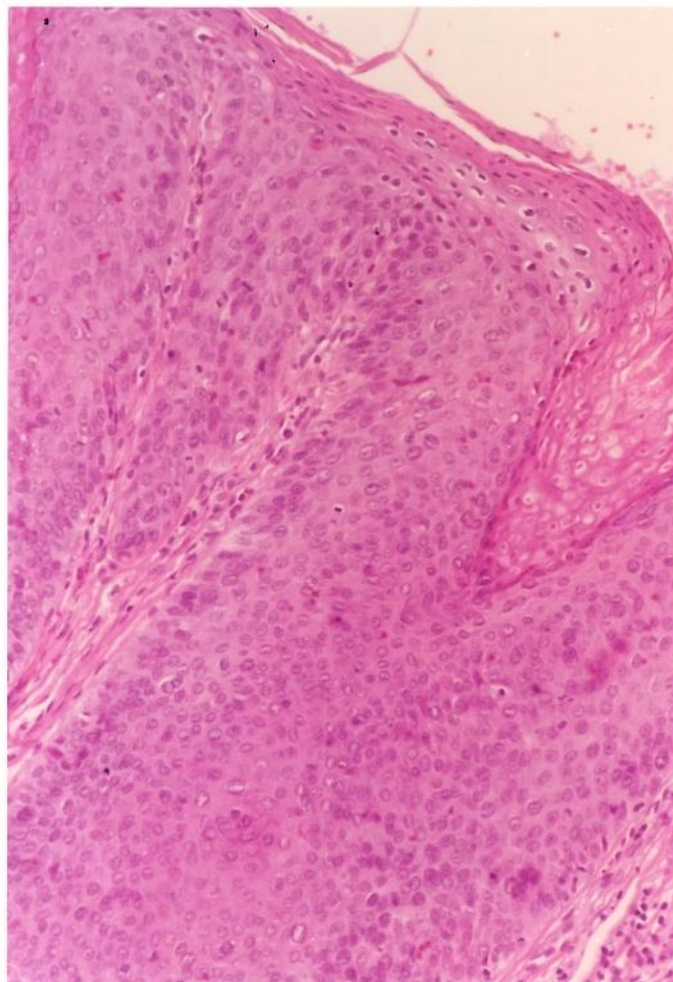


FIGURA 13 - VIN III do tipo bowenóide, com atipias coilocitóticas na superfície do epitélio (HE, 132x)

Dos 30 casos histologicamente sugestivos de infecção pelo HPV, 23 tinham o diagnóstico de VIN III de padrão bowenóide (Figura 13), dois eram VIN III do tipo simples (Figura 8), sendo que em um deles a coilocitose estava presente no epitélio atípico e em outro, no epitélio adjacente; e cinco correspondiam ao carcinoma estágio Ia, adjacentes às áreas de VIN III de padrão bowenóide.

5.4. Distribuição etária

A idade das pacientes variou de 15 a 88 anos, com a média geral de 49,8 anos.

Quando agrupamos apenas os casos de VIN III, a idade das pacientes variou de 15 a 82 anos, com média de 47,5 anos, desvio padrão de 20,2 anos e a mediana de 43,5 anos; sendo que 20% delas tinham 30 anos ou menos, e 43,3% até 40 anos (Figura 14).

Apesar de um número pequeno de casos de carcinoma estágio Ia, notamos que estes só ocorreram após os 40 anos, na faixa de 40 a 88 anos, com média de 61,1 anos, desvio padrão de 21,1 e mediana de 57,5 anos (Figura 14)

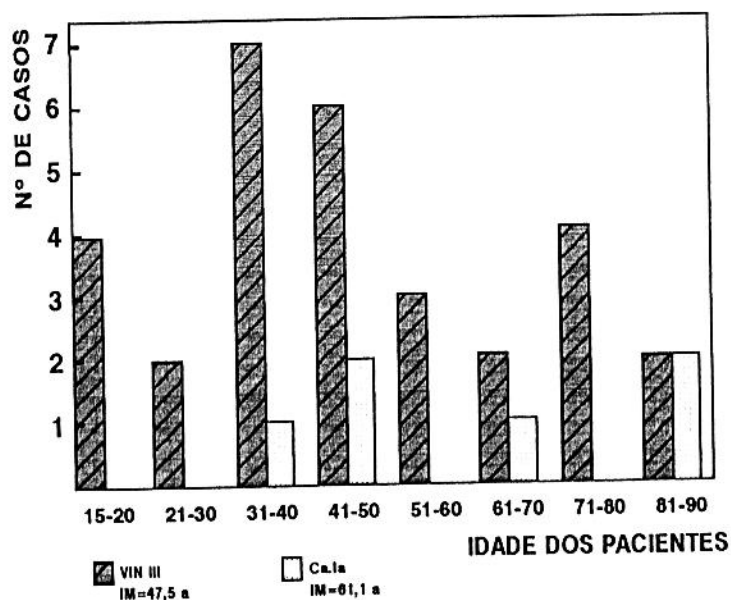


FIGURA 14 - Distribuição das idades das pacientes com diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial grau III e carcinoma escamoso estágio Ia da vulva

Do ponto de vista estatístico, quando comparamos através do teste t de "Student", as idades médias destes dois grupos de diferentes diagnósticos, encontramos $t = 1,45$, valor abaixo do t crítico de 2,03 para 34 graus de liberdade, sendo portanto não significativo (Tabela 2)

TABELA 2

Correlação entre a idade média e os diagnósticos de VIN III e Ca. Ia

	Número de casos	Idade média (anos)	Desvio Padrão
VIN III	30	47,5	20,2
Ca. Ia	6	61,1	21,1
t = 1,45		G.L. = 34	0,10 < p < 0,20
G.L. = grau de liberdade			
P = probabilidade			

Na variante bowenóide a média de idade foi de 49,5 anos, e no tipo simples, 53,7 anos. Uma paciente com 82 anos de idade apresentou associação das duas variantes histológicas.

A maioria das pacientes apresentava atipia coilocitótica (30 casos) e neste grupo, a idade variou de 15 a 88 anos, estando a média em 51,6 anos, sendo que mais da metade dos casos (17/30, ou seja 56,7%) tinham 50 anos ou menos. Por outro lado, nos poucos casos onde não se observou a atipia coilocitótica (seis casos), a idade variou de 18 a 67 anos, estando a média em 40,7 anos.

5.5. Lesões associadas no trato genital feminino inferior

Das 29 pacientes em estudo, 20 apresentavam associação, pregressa ou atual, com outras lesões na vulva ou em outros órgãos do trato genital feminino inferior, ou seja, cerca de 69%.

Dentro deste grupo de 20 pacientes, dez apresentavam outras lesões vulvares associadas, nove tinham patologias variadas no colo uterino, e duas na vagina (Tabela 3).

TABELA 3

Associação das lesões do trato genital feminino inferior com a neoplasia intraepitelial grau III ou carcinoma estágio Ia da vulva, presentes em 20 pacientes

Local	Tipo de lesão	Número de lesões
Colo Uterino	Carcinoma epidermóide	3a
	Neoplasia intraepitelial grau III	2
	Condiloma	2*
	Citologia oncótica classe III	2**
Vulva	Tumor recidivante (segundo informação clínica)	1
	Carcinoma epidermóide	2b
	Neoplasia intraepitelial grau II (diag. pregresso)	1c
	Neoplasia intraepitelial grau III (diag. pregresso)	5 b,d
	Líquen escleroso	1
	Hiperplasia escamosa	2d
	Condiloma	1c
Vagina	Carcinoma epidermóide	1
	Neoplasia intraepitelial grau III	1a
Total		24

* uma paciente com história de tricomoníase e sífilis tratada

** uma paciente gestante, e a outra com história de condiloma e molusco contagioso

a, b, c, d - lesões presentes em uma mesma paciente

5.6. Imunoperoxidase

A detecção do antígeno do capsídeo viral do HPV pelo método da imunoperoxidase foi positiva em 13 dos 36 casos, ou seja, em 36,1% dos casos estudados.

Dos 13 casos positivos, 12 eram VIN III e um carcinoma escamoso estágio Ia, sendo todos da variante histológica bowenóide. Onze deles apresentavam atipias coilocitóticas associadas (Tabela 4).

A idade dos casos positivos variou de 17 a 82 anos, com a idade média de 39,1 anos; sendo que 61,5% tinham até 40 anos. (Tabela 4).

TABELA 4

Distribuição dos casos positivos obtidos através da imunoperoxidase e hibridização "in situ", e sua relação com a idade média das pacientes, o diagnóstico e o padrão histológico, e a presença de atipias coilocitóticas associadas

	IMPX positiva	HIS positiva	IMPX ou HIS positiva	IMPX e HIS positiva
Nº de casos (total - 36)	13	15	23	5
Idade média (anos)	39,1	38,3	40,3	31,2
Diagnóstico Histológico				
VIN III	12	13	21	4
Ca. Ia	1	2	2	1
Padrão Histológico				
bowenóide	13	14	22	5
simples	0	1	1	0
Atipias Coilocitóticas				
presente	11	13	19	4
ausente	2	3	4	1

IMPX = imunoperoxidase

HIS = hibridização "in situ"

VIN III = neoplasia intraepitelial vulvar grau III

Ca. Ia = carcinoma escamoso estágio Ia da vulva

A positividade da reação estava presente nas camadas mais superficiais do epitélio atípico, junto às áreas de paraceratose e coilocitose, porém a distribuição e a quantidade de núcleos corados foi muito variável, sendo que a maioria dos casos apresentava poucos núcleos positivos e de distribuição focal (Figura 15).

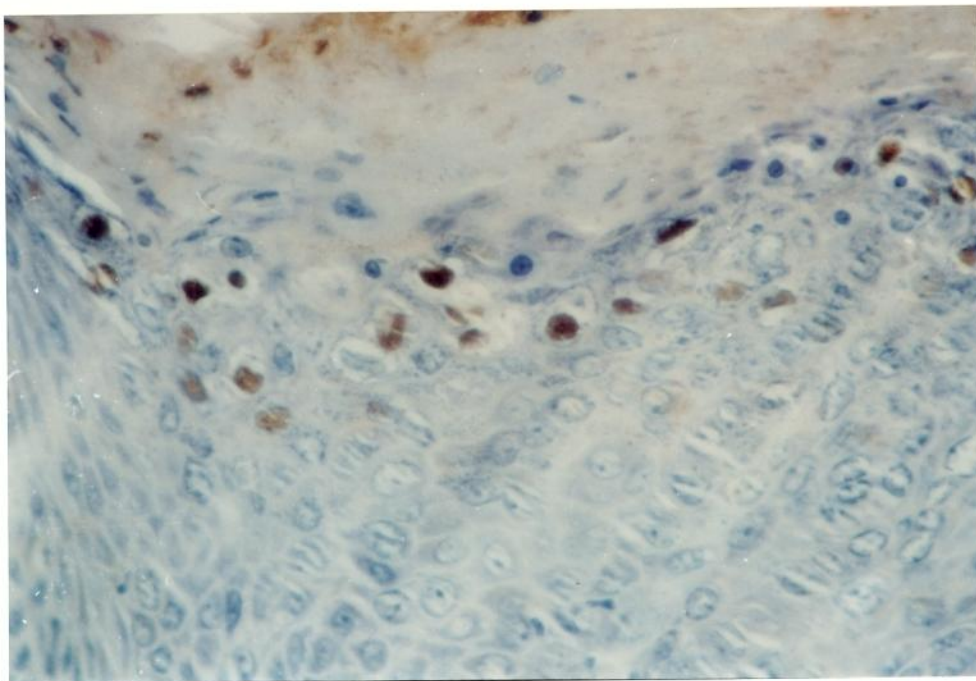


FIGURA 15 - Reação de imunoperoxidase positiva no terço superior do epitélio atípico (VIN III), predominantemente em células com atipias coilocitóticas (IMPX, 330x)

Em 33 casos o exame foi repetido de duas a cinco vezes, e em 24 deles os resultados da coloração foram sempre concordantes, enquanto que em nove casos houve ora resultados positivos, ora negativos, para o mesmo fragmento analisado.

A presença de um único núcleo corado, sem imagens duvidosas, foi suficiente para considerá-lo como positivo. Em vários dos fragmentos estudados (29 casos) observamos ao lado do epitélio atípico de VIN III, áreas de epitélio escamoso normal ou somente com alterações de condiloma. A positividade da reação ocorreu sempre nas áreas de epitélio atípico; porém, em um único caso, o epitélio adjacente à lesão também apresentou núcleos corados pela imunoperoxidase, correspondendo histologicamente a uma área de condiloma acuminado (Figura 16).

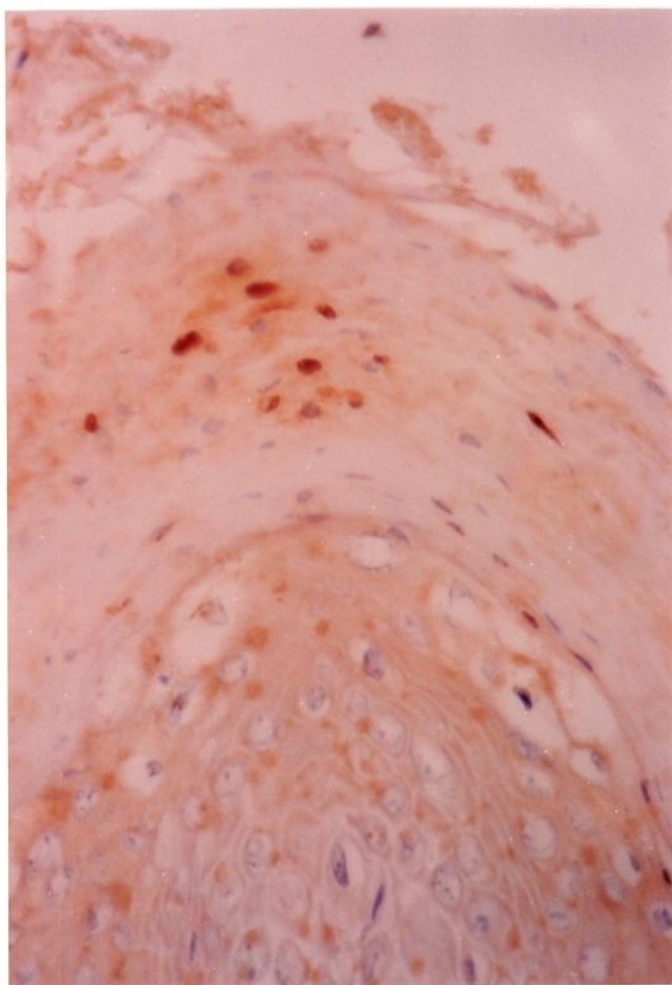


FIGURA 16 - Reação de imunoperoxidase positiva na área de paraceratose, em condiloma acuminado adjacente à lesão de VIN III (IMPX, 330x)

Em relação aos 23 casos negativos pelo método da imunoperoxidase, 18 eram VIN III e cinco carcinomas estágio Ia, sendo 20 da variante histológica bowenóide e três do tipo simples. Dezenove apresentavam atipias coilocitóticas. A idade variou de 15 a 88 anos, com a idade média de 55,8 anos; destas, 8,7% tinham 30 anos ou menos e 26% até 40 anos (Tabela 5).

TABELA 5

Distribuição dos casos negativos obtidos através da imunoperoxidase e hibridização "in situ", e sua relação com a idade média das pacientes, o diagnóstico e padrão histológico, e a presença de atipias coilocitóticas associadas

	IMPX negativa	HIS negativa	IMPX ou HIS negativa	IMPX e HIS negativa
Número de casos (total = 36)	23	21	31	13
Idade média (anos)	55,8	58	52,8	66,6
Diagnóstico histológico				
VIN III	18	17	26	9
Ca. Ia	5	4	5	4
Padrão Histológico				
bowenóide	20	19	28	11
simples	3	2	3	2
Atipias coilocitóticas				
presente	19	18	26	11
ausente	4	3	5	2

IMPX = imunoperoxidase

HIS = hibridização "in situ"

VIN III = neoplasia intraepitelial vulvar grau III

Ca. Ia = carcinoma escamoso estágio Ia da vulva

5.7. Hibridização "in situ"

Através deste método, encontramos positividade para o DNA do HPV em 15 dos 36 casos analisados (41,7%).

Dos 15 casos positivos pela hibridização "in situ", 13 correspondiam a VIN III e dois a carcinomas estágio Ia. Apenas um dos positivos tinha padrão histológico de carcinoma "in situ" simples, sendo todos os outros do tipo bowenóide. Doze deles mostravam alterações histológicas sugestivas de infecção pelo HPV (Tabela 4).

A idade dos casos positivos variou de 15 a 71 anos, com a idade média de 38,3 anos, sendo que 60% das pacientes tinham até 40 anos (Tabela 4).

A positividade, como na imunoperoxidase, também foi mais freqüente nos núcleos das camadas mais superficiais do epitélio, predominantemente no terço superior, embora também tenha sido observado em grau mais discreto nas células da camada intermediária (Figuras 17 e 18).

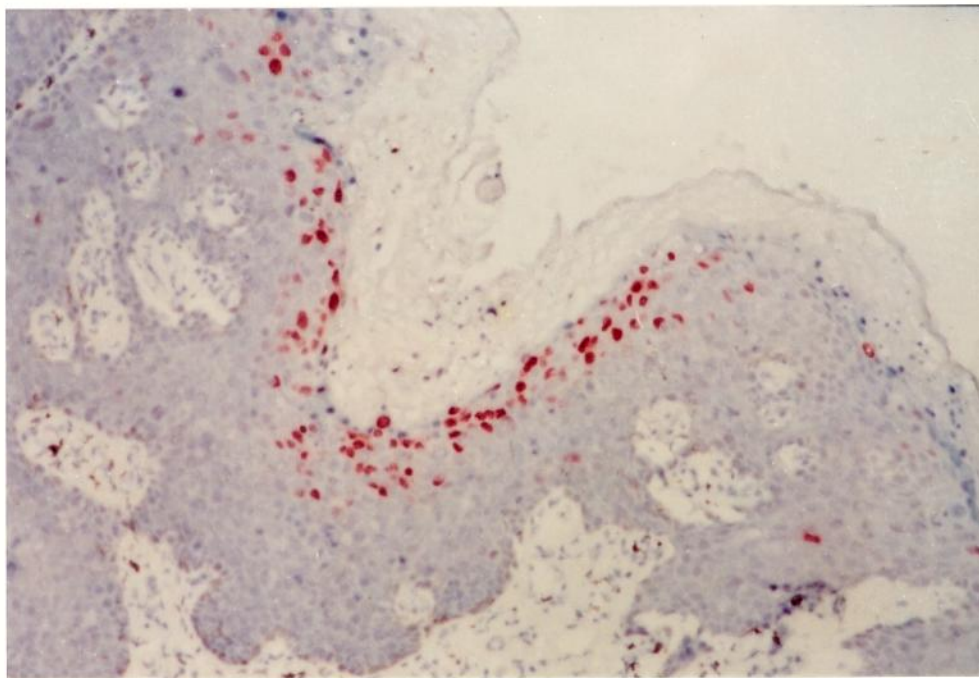


FIGURA 17 - Reação de hibridização "in situ" positiva para o HPV 16/18, predominantemente no terço superior do epitélio atípico (VIN III) (B. 62492, HES, 132X).

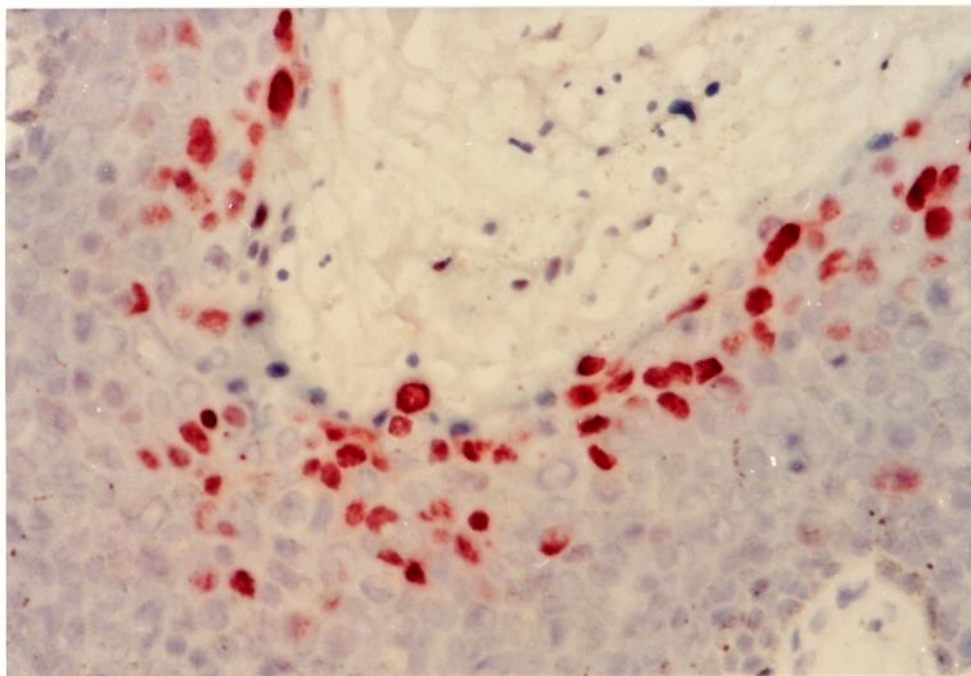


FIGURA 18 - Reação de hibridização "in situ" positiva para o HPV 16/18, predominantemente no terço superior do epitélio atípico (VIN III) (B. 62492, HES, 330x)

Por esta técnica, a positividade foi mais intensa e em maior número de células do que a observada através da imunoperoxidase.

Para melhor avaliação, devido a artefatos técnicos, o exame de hibridização teve que ser repetido dois ou três vezes em 11 casos. A avaliação histológica da reação ficou prejudicada no exame das sondas para o HPV 31/35/51 e 6/11 em um caso, e para a sonda do HPV 31/35/51 em outro, devido ao descolamento dos cortes durante o processamento, e perda da área-problema com o desbaste dos blocos em biópsias muito pequenas.

O DNA do HPV foi detectado predominantemente em áreas de epitélio atípico. Dentre 29 casos em que havia no fragmento analisado áreas de epitélio histologicamente normal ou apenas com alterações de condiloma, a positividade da reação também foi detectada em uma área de epitélio normal em um caso, e em outro em área de condiloma acuminado.

Todos os positivos pela hibridização "in situ" apresentaram DNA do HPV 16/18. (Anexo)

Em quatro casos (26,7%) houve associação de mais de um tipo viral, ou seja, além do DNA do HPV 16/18, três também foram positivos para o HPV 31/35/51, e outro para o HPV 6/11. Nestas lesões com dupla infecção, os diferentes tipos de vírus estavam presentes numa mesma região do fragmento, com intensidade variável de reação. Nos três casos de associação do DNA do HPV 16/18 com o 31/35/51, a positividade ocorreu apenas nas áreas de epitélio atípico (Figuras 19 e 20). Entretanto, o caso onde havia concomitância de infecção pelos HPV 16/18 e 6/11, era uma lesão de VIN III associada a condiloma acuminado. Ambos os tipos de sondas foram detectados tanto nas áreas de condiloma como nas de VIN III, porém com maior intensidade da reação para o HPV 16/18 nas áreas de VIN III e para o HPV 6/11 nas áreas de condiloma acuminado (Figuras 21 e 22).

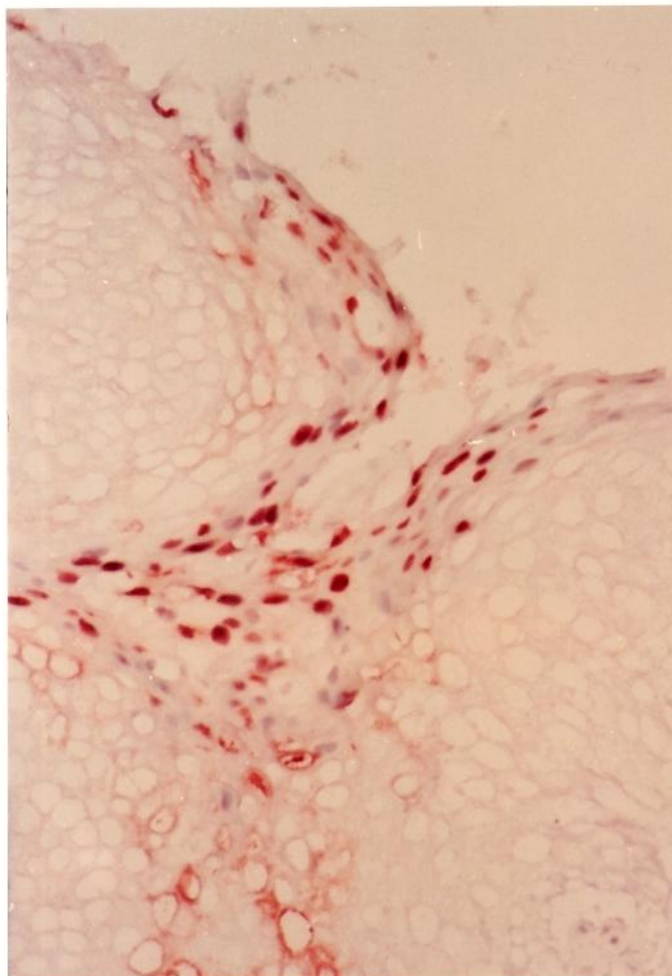


FIGURA 19 - Reação de HIS positiva para o HPV 16/18 no terço superior do epitélio atípico (VIN III) (B 43463, HIS, 330x).

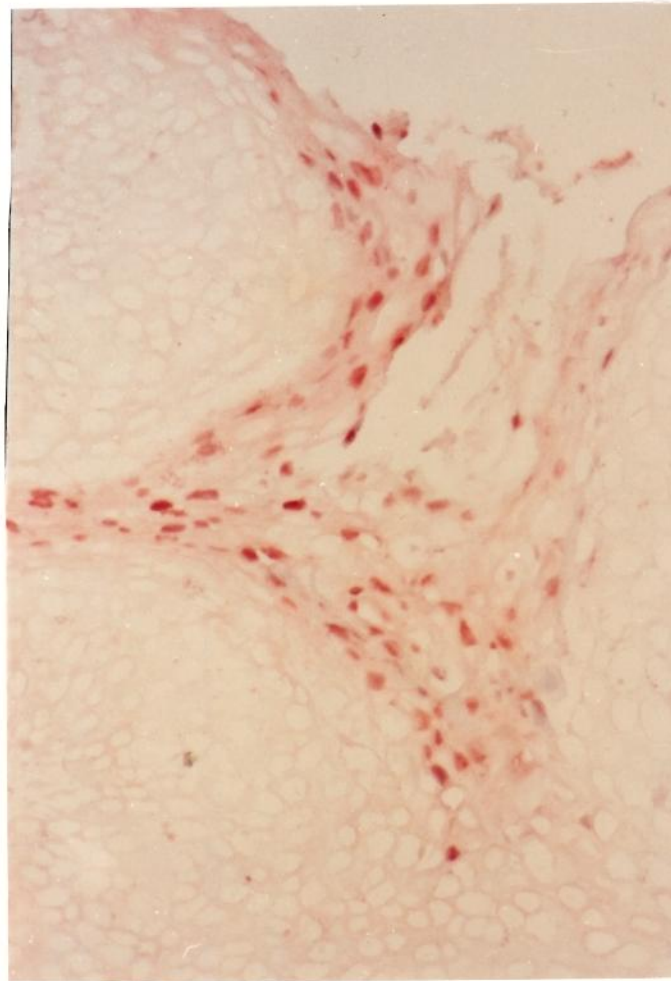


FIGURA 20 - Reação de HIS positiva para o HPV 31/35/51 na mesma área em que também foi positiva para o HPV 16/18 demonstrado na Figura 19 (B 43463, HIS, 330x).

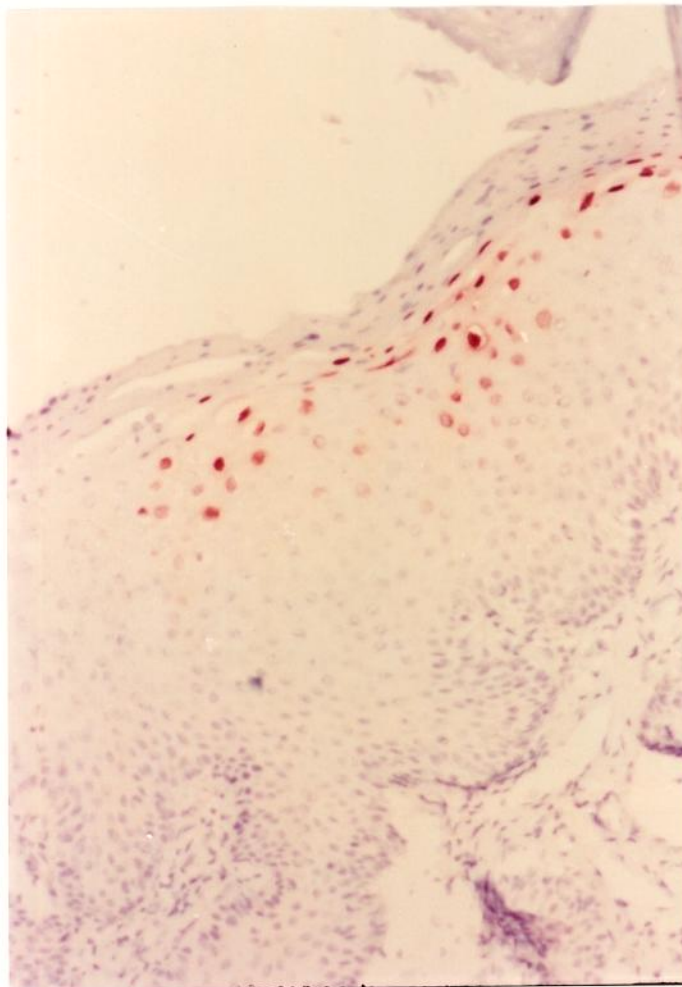


FIGURA 21 - Reação de H&S positiva para o HPV 6/11 em área de condiloma acuminado adjacente à lesão de VIN III (B 11362, H&S, 132x).

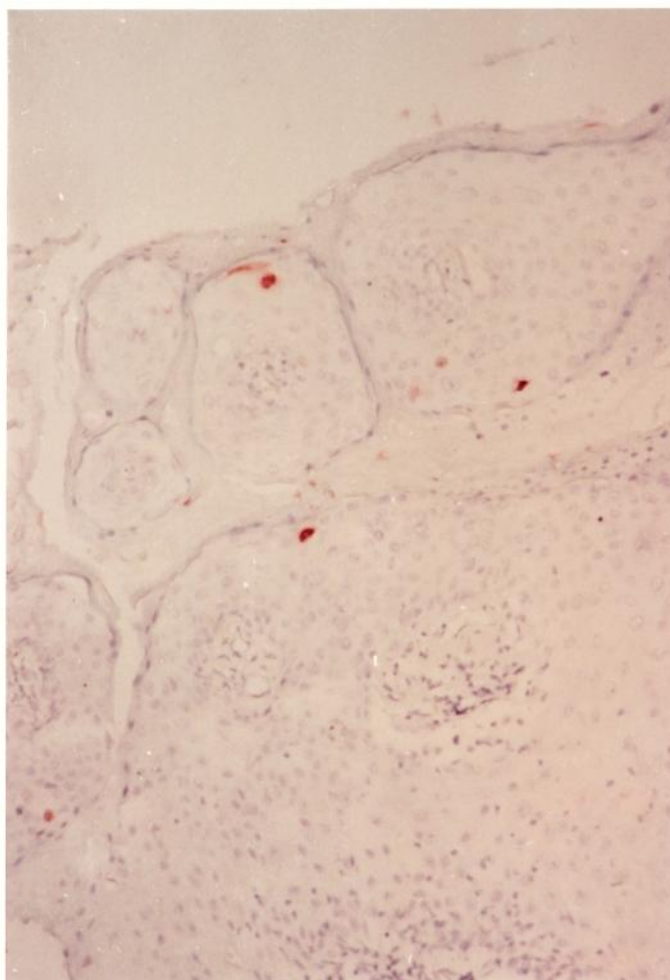


FIGURA 22 - Reação de HIS positiva para o HPV 16/18 em área de condiloma acuminado adjacente à lesão de VIN III, com raros núcleos corados (B 11362, HIS, 132x).

Em relação aos 21 casos negativos pela hibridização, 17 eram VIN III e quatro carcinomas estágio Ia, sendo 19 da variante histológica bowenóide e dois do tipo simples. Dezoito apresentavam atipias coilocitóticas. A idade variou de 26 a 88 anos, com a idade média de 57,9 anos; destas, 9,5% tinham 30 anos ou menos e, 23,8% até 40 anos (Tabela 5).

5.8. Relação entre as técnicas de imunoperoxidase e hibridização "in situ". Correlação dos dados morfológicos e as técnicas de detecção do vírus

Em relação à concordância de positividade entre as técnicas de imunohistoquímica e de hibridização do DNA nos 23 casos positivos através de um destes métodos, ela estava presente em apenas cinco casos, ou seja, os casos positivos não foram os mesmos para ambas as técnicas na maioria deles (Tabela 6). Destes cinco casos, quatro eram VIN III e um carcinoma estágio Ia. Todos eram da variante bowenóide e quatro apresentavam atipias coilocitóticas associadas. A idade deste grupo variou de 17 a 49 anos, com a idade média 31,2 anos, sendo que 40% tinham idade menor ou igual a 30 anos e 80% até 40 anos (Tabela 4).

TABELA 6

Relação entre as técnicas de imunoperoxidase e hibridização "in situ" quanto aos resultados positivos e negativos

	<i>Hibridização "in situ"</i>		Total
	Casos positivos	Casos negativos	
<i>Imunoperoxidase</i>			
casos positivos	5	8	13
casos negativos	10	13	23
Total	15	21	36

Quando se considerou a positividade total para a presença do HPV através de qualquer uma das técnicas, ou seja, para a detecção do antígeno do capsídeo ou do genoma viral, ela foi confirmada em 23 dos 36 casos analisados (63,9%). Destes 23 casos, 21 eram VIN III e dois carcinomas estágio Ia. Histologicamente, 22 casos eram da variante bowenóide e um do tipo simples; 19 apresentavam atipias coilocitóticas associadas. A idade média destas pacientes com qualquer dos exames positivos foi de 40,3 anos, variando entre 15 e 82 anos, com desvio padrão de 17,34, sendo que 26,1% tinham idade menor ou igual a 30 anos, e 56,5% inferior ou igual a 40 anos de idade (Tabela 4).

Quando observamos a positividade destes dois métodos em relação às diferentes amostras de uma mesma paciente, encontramos dados que não foram sempre concordantes, relacionados abaixo (Tabela 7):

TABELA 7

Relação da detecção do vírus em seis pacientes com exames múltiplos

Paciente	Nº caso	Material	Imunoperoxidase	Hibridização "in situ"
a	15	biópsia	negativo	negativo
	16	Vulvectomy parcial	positivo	negativo
b	19	biópsia	positivo	positivo - 16/18
	20	biópsia	negativo	positivo - 16/18
	21	Vulvectomy radical	negativo	positivo - 16/18
c	22	Vulvectomy simples	negativo	negativo
	23	Ressecção da lesão	negativo	positivo - 16/18
d	24	biópsia	negativo	positivo - 16/18
	25	biópsia	positivo	positivo - 16/18
e	26	biópsia	negativo	negativo
	27	Vulvectomy simples	negativo	negativo
f	28	biópsia	negativo	negativo
	29	Ressecção da lesão	negativo	negativo

Assim, a frequência de positividade de uma ou outra reação, em relação ao número de pacientes estudadas foi de 69%, ou seja, 20 das 29 pacientes apresentaram pelo menos um dos exames positivos pelas técnicas aplicadas (Anexo).

Entre os 36 espécimes analisados, 13 (36,1%) foram negativos para ambas as técnicas. Destes, nove eram VIN III e quatro carcinomas estágio Ia. Quanto à análise histológica, 11 eram de padrão bowenóide e dois do tipo

simples; 11 mostravam atípias coilocitóticas. A idade média destas pacientes era de 66,6 anos, variando de 39 a 88 anos, com desvio padrão de 14,85 anos; e somente uma paciente tinha menos de 40 anos, e nenhuma apresentava idade inferior a 30 anos (Tabela 5).

A comparação das médias de idade dos grupos com reação positiva e negativa, através do teste t de "Student", revelou valor de t acima do crítico, sendo portanto estatisticamente significante (Tabela 8).

TABELA 8

Distribuição dos casos positivos e negativos das reações (IMPX e HIS) em relação à idade média das pacientes

	Número de casos	Idade média (anos)	Desvio padrão
Positivos	23	40,3	17,34
Negativos	13	66,6	14,85
t = 4,79	G.L. = 34		p<0,001

t = teste t de "Student"

G.L. = grau de liberdade

p = probabilidade

A atipia coilocitótica foi relacionada com a positividade das técnicas de imuno-histoquímica e de hibridização "in situ". A atipia coilocitótica foi graduada em leve, moderada e intensa. Nos 14 casos em que era leve a detecção do HPV ocorreu em sete deles (50%), sendo cinco positivos só na imunoperoxidase e dois somente na hibridização. Se agruparmos as intensidades moderada e intensa da atipia coilocitótica, temos 16 casos, dos quais 12 foram positivos (75%), sendo dois positivos somente pela imuno-histoquímica, seis só

pela hibridização "in situ", e os quatro restantes foram positivos pelos dois métodos concomitantemente. Entretanto, pela análise estatística, estes valores não foram significantes através do teste do qui-quadrado (χ^2) (Tabela 9).

TABELA 9

Relação da intensidade da atipia coilocitótica com a positividade das reações de IMPX e HIS

	Nº	IMPX (+)	HIS (+)	IMPX e HIS (+)	TOTAL IMPX e/ou HIS (+)
AK leve	14	5	2	0	7 (50%)
AK moderada intensa	16	2	6	4	12 (75%)

$\chi^2 = 2,009$

G.L. = 1

$p > 0,05$

AK = atipia coilocitótica

(+) = reação positiva

χ^2 = teste do qui-quadrado

G.L. = grau de liberdade

p = probabilidade

Analisando separadamente a positividade para cada um dos métodos em relação ao grau de atipia coilocitótica, observamos que a detecção do DNA viral através da HIS foi maior, e estatisticamente significativa, nos casos com atipia coilocitótica em grau moderado e intenso (Tabela 10); embora, na técnica da imunoperoxidase, esta associação não foi confirmada através da análise estatística (Tabela 11).

TABELA 10

Relação da intensidade da atipia coilocitótica com a positividade através da hibridização "in situ"

	Número de casos	HIS positiva	HIS negativa
Atipia coilocitótica			
leve	14	2	12
moderada/intensa	16	10	6
$\chi^2 = 5,362$ G.L. = 1 $p < 0,05$ HIS = hibridização "in situ" χ^2 = teste do qui-quadrado G.L. = grau de liberdade p = probabilidade			

TABELA 11

Relação da intensidade da atipia coilocitótica com a positividade através da imunoperoxidade

	Número de casos	IMPX positiva	IMPX negativa
Atipia coilocitótica			
leve	14	5	9
moderada/intensa	16	6	10
$\chi^2 = 0,010$ G.L. = 1 $p > 0,05$ χ^2 = teste do qui-quadrado G.L. = grau de liberdade p = probabilidade			

Entretanto, em seis casos em que a atipia coilocitótica estava ausente, a detecção do HPV foi possível em quatro deles, sendo um apenas pela imunohistoquímica, dois somente pela hibridização e um pelos dois métodos.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Relativamente poucos trabalhos têm sido publicados relacionando neoplasia intraepitelial vulvar e carcinoma estágio Ia da vulva e infecção pelo papilomavírus humano. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi o estudo desta relação no nosso material, comparando-os com a literatura.

6.1. Informações clínicas e dados do exame físico e macroscópico

6.1.1. Exame físico

Apesar da alta frequência de dados incompletos quanto às queixas das pacientes, exame físico e macroscópico das lesões, os nossos dados foram semelhantes aos relatados na maioria dos trabalhos publicados, ou seja, lesões discrômicas e elevadas (FU & REAGAN, 1989; PRAT, 1991; REID & GREENBERG, 1991; WOODRUFF, 1991; KURMAN et al., 1992b)

6.1.2. Localização das lesões

A localização das lesões na vulva varia nos diferentes trabalhos, estando a maioria localizada como nos nossos casos, em grandes e pequenos

lábios, e em menor número em fúrcula vaginal, clitóris e períneo (POWELL et al., 1986; RAGNARSSON et al., 1987; BAGGISH et al., 1989; FU & REAGAN, 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989).

6.1.3. Multiplicidade de lesões

Quanto à presença de lesões múltiplas na região vulvar, a frequência na literatura varia de 30% a 81% (CHAFE et al., 1988; BARBERO et al., 1990), sendo a maioria ao redor de 50% (POWELL et al., 1986; RUEDA-LEVERONE et al., 1987; FU & REAGAN, 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989; SHAFI et al., 1989). Em nosso trabalho, 38,9% das lesões eram multifocais. O diagnóstico de lesão multifocal foi baseado na presença de foco descontínuo da doença através da descrição clínica, macroscópica ou análise microscópica.

A idade média das pacientes com lesões multifocais foi de 48 anos, sendo que apenas um terço delas tinha mais de 50 anos. Neste grupo havia lesões associadas em outros locais do trato genital feminino inferior em 21,4%, ou seja, lesões multicêntricas.

As pacientes com lesões unifocais tinham idade média de 51 anos, sendo que nestas a multicentricidade de lesões também ocorreu numa frequência de 36,8%.

Na literatura é observado que as lesões multifocais ocorrem mais frequentemente em pacientes jovens (TWIGGS et al., 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989), sendo que 80% tem menos de 40 anos; as unifocais acometem pacientes mais idosas, pré-menopausadas, com 70% delas acima de 40 anos

(TWIGGS et al., 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989). Entretanto, POWELL et al. (1986) mostram em pacientes com menos de 50 anos frequência de 50% de lesões multifocais e 50% unifocais, ressaltando porém que somente 8% eram multifocais no grupo etário maior de 50 anos.

Nota-se também alta associação entre lesões multifocais e multicêntricas (BORNSTEIN et al., 1988), diferente dos resultados encontrados no nosso trabalho, onde a distribuição etária foi semelhante para lesões únicas ou múltiplas, bem como para a presença de lesões associadas multicêntricas.

6.2. Diagnóstico histológico

6.2.1. Variante histológica

O padrão histológico das lesões correspondeu à variante bowenóide em 90% dos casos. Sua incidência varia de 24% a 66% em diferentes trabalhos (POWELL et al., 1986; FU & REAGAN, 1989; PARK et al., 1991a), sendo freqüente a associação dos dois tipos, isto é, bowenóide e simples, em uma mesma lesão (BUCKLEY et al., 1984), ambas com história natural semelhante e intimamente associadas com a infecção pelo HPV (PARK et al., 1991b).

Encontramos associação dos dois diferentes padrões histológicos em apenas uma lesão estudada.

KURMAN, TOKI, SCHIFFMAN (1993) relatam que existem diferenças clínicas e epidemiológicas entre as variantes histológicas no carcinoma epidermóide invasivo da vulva, entretanto, não se sabe se estas diferenças se aplicam às neoplasias intraepiteliais vulvares.

6.2.2. Extensão para apêndices cutâneos

A extensão de células atípicas para os anexos cutâneos varia de 10% a 60% (BAGGISH et al., 1989; FU & REAGAN, 1989; BENEDET et al., 1991; KURMAN et al., 1992b), dependendo do tipo de ressecção, isto é, se biópsia ou ressecção mais extensa da lesão, (BENEDET et al., 1991), sendo que na maioria dos casos, o comprometimento de anexos ocorre em 50% dos casos, mais freqüentemente para os folículos pilosos (PRAT, 1991).

Encontramos esta extensão em 56,5% dos casos onde os anexos puderam ser analisados, sendo dez VIN III e três carcinomas estágio Ia, e destes apenas um caso não era da variante bowenóide. Do ponto de vista prático, este dado nos mostra que os tratamentos mais superficiais como medicação tópica, criocirurgia ou cauterização a laser, podem deixar epitélio atípico na profundidade do derma, por extensão aos anexos.

6.2.3. Sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV

Foram detectados sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV em 83,3% (30/36) dos casos sendo vinte e oito da variante bowenóide (vinte e três VIN III e cinco Ca. Ia) e dois VIN III do tipo simples. Este nosso dado é relativamente alto em relação aos encontrados na literatura, que variam de 20% a 75% (RUEDA-LEVERONE et al., 1987; HUSSEINZADEH et al., 1989; BARBERO et al., 1990, 1993; BENEDET et al., 1991). Atribuímos esta grande freqüência de atipia coilocitótica no nosso material ao predomínio da variante bowenóide, onde as atipias celulares mais acentuadas fazem parte do quadro histológico e as atipias coilocitóticas estão freqüentemente associadas.

Os critérios morfológicos associados com a infecção do HPV incluem (SINGER et al., 1985; KLUZAK & KRAUS, 1987; SPITZER et al., 1990; KURMAN et al., 1992b; MORELLI et al., 1993): atipia coilocitótica, disqueratose, hiperqueratose, parakeratose, acantose, alongamento dos cones epiteliais, papilomatose e hiperplasia da camada basal e parabasal do epitélio. Exceto pela presença de atipia coilocitótica bem caracterizada, os outros dados histológicos não são específicos quando analisados isoladamente; entretanto, quando presentes em conjunto são altamente sugestivos de infecção viral (CRUM, 1987; KREBS, 1989b). Esta associação de dados como critério histológico é importante para evitar o excesso de diagnóstico de infecção viral.

Além disso, deve ser lembrado que nem todas as infecções pelo HPV apresentam coilocitose e são consideradas infecções latentes (NUOVO, 1990; SYRJÄNEN, 1992), ou seja, aquelas onde os exames físico, colposcópico, cito e histológico não mostram anormalidades, porém o vírus é detectado através da hibridização dos ácidos nucleicos (KOUTSKY et al., 1988; ROMAN & FIFE, 1989; SCHNEIDER et al., 1991; SYRJÄNEN, 1992).

Quando se compara a histologia com o método da hibridização molecular para detecção da infecção pelo HPV, observa-se que o diagnóstico microscópico é altamente específico quando realizado criteriosamente, porém pouco sensível, pois segundo a literatura, apenas 10% a 30% das infecções são diagnosticadas através deste método (KOUTSKY et al., 1988; SCHNEIDER, 1989; SYRJÄNEN, 1990).

As alterações citológicas e histológicas que ocorrem no epitélio escamoso infectado são secundárias aos produtos proteicos sintetizados pelo vírus, e a expressão gênica viral está diretamente relacionada ao processo de diferenciação e maturação celular (CRUM et al., 1982; STOLER & BROKER, 1986; CRUM, 1987; KIYABU et al., 1989; PARK et al., 1991b). Assim,

conforme aumenta a gravidade da displasia, diminui o índice de atipias coilocitóticas (BENEDET et al., 1991).

Também o tipo de tecido infectado influencia o índice do diagnóstico de infecção pelo HPV através da microscopia óptica. É observado que entre diferentes patologistas, a concordância no diagnóstico de infecção viral é maior no colo uterino do que na vulva, onde a coilocitose não é tão nítida ou está freqüentemente ausente, dificultando seu diagnóstico nesta localização (SPITZER et al., 1990).

Embora a histologia tenha certa correlação com o tipo de HPV, ela não é absoluta (KOUTSKY et al., 1988; WILBUR et al., 1988; FRANQUEMONT et al., 1989) pois, neoplasias intraepiteliais de alto grau podem apresentar tipos virais de baixo risco, e lesões de baixo grau, vírus de alto risco. Destas observações, não podemos seguramente prever o tipo viral pela morfologia da lesão, embora a maioria das lesões de alto grau esteja associada a tipos virais de alto risco (CRUM, 1987; GUPTA et al., 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; CRUM & BURKETT, 1989; YUN et al., 1989). Também é observado que um tipo viral pode produzir lesões com diferentes graus de intensidade (CRUM, 1987; BUSCEMA et al., 1988), e que uma única lesão pode apresentar vários tipos virais associados (CRUM, 1987; GUPTA et al., 1987; REID et al., 1987; CRUM & BURKETT, 1989; YUN et al., 1989).

Quando correlacionamos a presença de atipias coilocitóticas com a uni e multifocalidade das lesões, não encontramos diferenças, o que concorda com os dados de JONES et al. (1990) e TWIGGS et al. (1988), embora RUEDA-LEVERONE et al. (1987) encontre maior associação de atipia coilocitótica nas lesões múltiplas.

6.3. Carcinoma superficialmente invasivo da vulva estágio Ia

Em relação aos carcinomas estágio Ia da vulva, foram analisados em conjunto com os casos de VIN III por serem poucos, isto é, apenas seis casos.

Em cinco deles foram detectados sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV, todos da variante histológica bowenóide, e havia extensão para anexos na metade deles. Todos apresentavam VIN III adjacente e nenhum, invasão vascular.

Na literatura, a associação com VIN III adjacente à área de invasão varia de 60% a 83% (WILKINSON, 1991; KELLEY et al., 1992). Os padrões de infiltração neoplásica (WILKINSON, 1987, 1991; FU & REAGAN, 1989) são definidos como: compressivo (50% dos casos) onde os blocos tumorais são bem definidos, arredondados ou ovalados, com bordos regulares, sem ou com leve reação desmoplásica do estroma; infiltrativo (17% dos casos) quando o tumor invade radialmente o estroma sob a forma de cordões, com aparente reação desmoplásica do estroma. O restante é de padrão misto. A maioria dos autores considera que o padrão infiltrativo está associado a um maior índice de envolvimento vascular e metástase ganglionar (CRUM, 1987; WILKINSON, 1991). Entretanto, a invasão vascular é muito rara em tumores com profundidade de invasão menor ou igual a 1mm (CRUM, 1987; KELLEY et al., 1992; KURMAN et al., 1992b).

O padrão de infiltração no nosso material era compressivo em três casos, infiltrativo em dois, e um apresentava associação dos padrões infiltrativo e compressivo.

ATAMDEDE & HOOGERLAND (1989) relatam um caso de metástase ganglionar em carcinoma vulvar estágio Ia, definido e medido como recomendado pela ISSVD, e sem invasão vascular detectada. Assim, o dado

isolado da profundidade de invasão não parece ser o único parâmetro que determina a sua evolução, devendo-se também fornecer no laudo anatomopatológico a espessura do tumor, o método de medição utilizado, o diâmetro da lesão, o grau de diferenciação histológica, a presença ou não de invasão vascular e o padrão de crescimento do tumor. Devido aos poucos casos na literatura, e até que sejam realizados estudos com seguimento, o laudo deve ser descritivo e minucioso, para que o clínico possa estadiar mais adequadamente a lesão, e entender o seu comportamento biológico (CRUM, 1987; KELLEY et al., 1992).

6.4. Distribuição etária

A idade média das pacientes com VIN III varia nos diversos trabalhos, de 36 a 54 anos, a maioria estando ao redor de 39 anos (BUCKLEY et al., 1984; TWIGGS et al., 1988; BENEDET et al., 1991; HØRDING et al., 1991; BARBERO et al., 1993), sendo que quase a metade delas tem menos de 40 anos (BUCKLEY et al., 1984; FU & REAGAN, 1989; WOODRUFF, 1991).

Em nossa casuística, a idade média foi de 47,5 anos, sendo que 43,3% das pacientes tinham menos de 40 anos, em concordância com a literatura.

Em relação ao carcinoma vulvar estágio Ia, a idade média é de 60 anos (KELLEY et al., 1992). Assim parece que pacientes mais velhas possuem maior associação de lesão invasiva associada ao VIN. Encontramos idade média de 61,1 anos, concordando com a literatura, e muito maior que nas pacientes com VIN III, sendo que neste grupo de seis casos apenas uma paciente tinha menos de 40 anos.

Apesar da idade média dos VIN III ser cerca de 15 anos mais jovem do que a dos casos de Ca. Ia, do ponto de vista estatístico, esta diferença não foi significativa. Devemos no entanto, comentar alguns pontos importantes. O número de casos de Ca. Ia foi muito pequeno, apenas seis, o que poderia interferir na análise matemática. Além disso, o desvio padrão para a idade média dos dois grupos é muito grande, de quase 20 anos, indicando que há uma faixa de idade na qual os dados se imbricam. Acreditamos que se o número de casos de Ca. Ia fosse aumentado, esta diferença poderia se estabelecer. Por outro lado, os 30 diagnósticos de VIN III ocorreram em uma ampla faixa etária, desde os 15 aos 82 anos, embora a maioria se concentrasse na faixa dos 15 aos 50 anos. Desta observação podemos depreender que as lesões de VIN III parecem ter um longo período de evolução antes de se tornarem invasivas. Isto aponta para a necessidade da introdução do exame detalhado da vulva na rotina ginecológica, contribuindo para a detecção e tratamento precoce destas lesões.

A maioria dos trabalhos não comenta a relação entre tipo histológico e idade. Entretanto FU & REAGAN (1989), relacionam o padrão bowenóide com idade mais jovem (média de 41 anos) e o simples com média de 66 anos, diferentemente dos nossos achados que foram semelhantes, isto é, 49,5 anos para o padrão bowenóide e 53,7 anos para o simples, apesar dos poucos casos desta variante. Apenas um caso apresentava associação de ambos os tipos histológicos e esta era uma paciente muito idosa, com 82 anos.

Pacientes com sinais histológicos sugestivos de infecção pelo HPV são geralmente mais jovens com uma diferença de dez a 20 anos (CRUM et al., 1984; RUEDA-LEVERONE et al., 1987; BARBERO et al., 1990; JONES et al., 1990). Em nosso trabalho isto não foi observado, ou seja, a maioria das pacientes apresentou atipia coilocitótica, ficando a média deste grupo em 51,6 anos. Nos poucos casos onde não foi encontrada a atipia coilocitótica (6/36), a idade média

foi de 40,7 anos. Este dado aparentemente conflitante com a literatura pode ser devido ao pequeno número de casos.

O comportamento biológico do VIN varia desde a regressão espontânea, principalmente em mulheres jovens (FU & REAGAN, 1989), ou recorrência associada à multifocalidade ou ressecção inadequada das lesões (FU & REAGAN, 1989; KURMAN et al., 1992b), até a progressão para invasão, que ocorre em cerca de 6% dos casos, principalmente em pacientes mais idosas ou imunodeprimidas (FU & REAGAN, 1989; HØRDING et al., 1991; PRAT, 1991; WOODRUFF, 1991; BARBERO et al., 1993).

Analisando-se estes dados da literatura, parece que o VIN III afeta duas populações distintas (CRUM et al., 1984; CRUM, 1987; HØRDING et al., 1991; PARK et al., 1991a):

- 1ª) pacientes mais jovens, freqüentemente associado com o HPV e com baixo risco de progredir para invasão,
- 2ª) grupo etário mais idoso, com baixa associação com o HPV, e maior risco de progressão para neoplasia invasora.

Desta observação é aventada a possibilidade de que a mesma lesão histológica em grupos etários distintos tenha diferente patogênese. Portanto, além das doenças sexualmente transmissíveis, devem ser investigados outros fatores de risco em diferentes populações que possam contribuir para o comportamento biológico variado destas lesões (CRUM & BURKETT, 1989; TOKI et al., 1991; CRUM, 1992; MITCHELL et al., 1993).

Além da idade e do estado imune das pacientes, é considerado que a quantificação do DNA nuclear da célula epitelial (estudo da ploidia) poderia identificar um subgrupo de lesões com maior risco para invasão (POWELL et al.,

1986; KREBS, 1989a). Entretanto os resultados destes trabalhos ainda são muito discordantes (CRUM, 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; SCHNEIDER, 1989).

6.5. Lesões associadas no trato genital feminino inferior

É freqüente a associação de outras lesões no trato genital feminino inferior em pacientes com VIN III, principalmente no colo uterino, cuja freqüência varia de 34% a 68% na maioria dos trabalhos (POWELL et al., 1986; BERGERON et al., 1987; BORNSTEIN et al., 1988; BAGGISH et al., 1989; HUSSEINZADEH et al., 1989). Em menor grau associam-se lesões na vagina em cerca de 13% dos casos (CHAFE et al., 1988), sugerindo um carcinógeno comum no desenvolvimento destas neoplasias, (BECKMAN et al., 1988; BUSCEMA et al., 1988; REID & GREENBERG, 1991) e a necessidade de um rastreamento de todo o trato genital feminino inferior nestas pacientes (CHAFE et al., 1988).

Também é descrita a associação com doenças sexualmente transmissíveis, as quais ocorrem em cerca de 30% das pacientes com VIN III (POWELL et al., 1986). Além da história de condiloma vulvar presente em 15% a 30% dos casos (CRUM et al., 1984; POWELL et al., 1986; FU & REAGAN, 1989; PRAT, 1991; BARBERO et al., 1993), 10% a 38% apresentam infecção genital herpética (CRUM, 1982; FU & REAGAN, 1989), ou história de gonorréia e sífilis (POWELL et al., 1986).

A multicentricidade está freqüentemente associada a grupos etários mais jovens e à infecção pelo HPV (RUEDA-LEVERONE et al., 1987; BORNSTEIN et al., 1988; FU & REAGAN, 1989; HØRDING et al., 1991).

Embora a maioria dos trabalhos relacione lesões multicêntricas com a presença de infecção pelo HPV, HØRDING et al. (1991) não conseguiram estabelecer esta associação.

Os nossos achados quanto à frequência e distribuição de lesões associadas no trato genital feminino inferior foram semelhantes aos relatados na literatura, ocorrendo em 69% dos casos, dos quais 45% estavam localizadas no colo uterino.

A idade média das pacientes com lesões multicêntricas foi de 44 anos e 90% destas lesões apresentavam atipia colocitótica, concordando com a maioria dos autores.

Quanto à presença das chamadas lesões distróficas associadas, isto é, hiperplasia escamosa e líquen escleroso, são mais frequentemente estudadas nos carcinomas invasores da vulva, variando de 15% a 75% (CRUM & BURKETT, 1989; HØRDING et al., 1991; WILKINSON, 1991). Em relação ao VIN, esta associação é descrita em 28% a 40% (BARBERO et al., 1990, 1993), ocorrendo principalmente em pacientes mais idosas (BARBERO et al., 1990).

Três pacientes apresentaram distrofia vulvar associada ao VIN, cuja idade variou de 33 a 82 anos, sendo portanto a casuística muito pequena para comparação entre faixa etária e estas lesões com a literatura.

A detecção de carcinoma invasor da vulva associado ao VIN varia de 2% a 18% na literatura (CHAFE et al., 1988; HUSSEINZADEH et al., 1989; WILKINSON, 1991), sendo portanto baixa a sua incidência. Apenas duas pacientes no nosso material tinham carcinoma invasivo da vulva associado ao VIN, com idade de 38 e 74 anos. A paciente mais jovem apresentava história de VIN III há cinco anos, concluindo-se que embora raro, e mais frequentemente associado a pacientes idosas ou imunodeprimidas, a progressão do VIN para

invasão pode ocorrer. Por outro lado, uma outra paciente tinha história de VIN III há 20 anos e não apresentou progressão para invasão. Ambas pacientes com carcinoma vulvar invasivo apresentavam VIN adjacente à área de invasão e não tinham história de imunodepressão.

6.6. Imunoperoxidase

Na maioria dos trabalhos, o índice de detecção para o antígeno do capsídeo viral varia de 0% a 10% das lesões de VIN III, enquanto alguns autores encontraram positividade de até 64% (CRUM, 1987; RUEDA-LEVERONE et al., 1987; SYRJÄNEN et al., 1987; PILOTTI et al., 1989; PRAT, 1991).

Encontramos positividade de 36,1% em nosso material, com intensidade variável, distribuição focal nos núcleos dos queratinócitos do terço superior do epitélio, mais especificamente nos coilócitos e células paraceratóticas, e mais raramente, em áreas sem alterações citológicas.

A imunoperoxidase está relacionada com a concentração de vírus maduros e produção do capsídeo viral, o qual é um evento tardio no ciclo biológico do vírus e ocorre nas camadas superficiais mais diferenciadas do epitélio (CRUM et al., 1982; SINGER et al., 1985; SATO et al., 1986; KLUZAK & KRAUS, 1987; FU & REAGAN, 1989; NOFFSINGER et al., 1992), e geralmente sua distribuição é focal (KURMAN et al., 1981; CRUM, 1987).

Além da necessidade da presença de partículas virais completas, a detecção do antígeno do capsídeo viral correlaciona-se com o grau de coilocitose e com a morfologia do epitélio (KIMURA & MASUDA, 1985; NAGAI et al., 1987).

A positividade da reação é geralmente detectada em áreas de atipia coilocitótica (CRUM et al., 1982; GUPTA et al., 1987; RUEDA-LEVERONE et al., 1987). Entretanto, células adjacentes com as mesmas características morfológicas são freqüentemente negativas (SYRJÄNEN et al., 1987). Além disso, a reação positiva não é confinada apenas às células coilocitóticas, e células que contém o vírus não podem ser distinguidas daquelas que não os possuem através da coloração de hematoxilina - eosina de rotina.

A neoplasia vulvar freqüentemente apresenta áreas com efeito citopático viral (GUPTA et al., 1987). Entretanto, a ausência de evidência histológica de infecção viral, não garante que a lesão não esteja relacionada com o vírus (NOFFSINGER et al., 1992).

Os efeitos citopáticos do vírus e a expressão dos genes tardios relacionados com a produção de vírus maduros e proteínas estruturais do capsídeo viral estão interligados com a morfologia da lesão, e são dependentes do grau de diferenciação celular e diferenciação do epitélio escamoso (CRUM et al., 1982; GUPTA et al., 1987; NAGAI et al., 1987; HOWLEY & SCHLEGEL, 1988).

Como a freqüência de detecção do HPV depende da presença de uma população celular capaz de maturação, o baixo índice de positividade nas lesões pré-neoplásicas de alto grau deve-se ao baixo índice de replicação e maturação viral, pois estas lesões são compostas por uma população celular imatura aneuplóide com escassa diferenciação escamosa terminal, dificultando que o ciclo biológico do vírus seja completado (CRUM, 1982; CRUM et al., 1992; SATO et al., 1986; NOFFSINGER et al., 1992).

Embora a detecção do HPV através da IMPX esteja relacionada mais freqüentemente a lesões de padrão histológico bowenóide contendo coilocitose, e a lesões multifocais e multicêntricas, alguns destes achados não foram

confirmados em nosso estudo; ou seja, tanto os casos positivos quanto os negativos pelo estudo imuno-histoquímico apresentaram distribuição semelhante em relação à presença de coilocitose, multifocalidade e multicentricidade. BORNSTEIN et al. (1988) também não encontraram relação entre a presença de HPV e lesões multicêntricas.

Apesar de termos apenas seis casos de lesões sem atipias coilocitóticas associadas, a positividade da reação imuno-histoquímica foi semelhante nos grupos com (36,7%) e sem coilocitose (33,3%). Desta forma, não podemos nos basear no dado da presença de coilocitose para prever a positividade da reação imuno-histoquímica.

Também não conseguimos demonstrar estatisticamente, correlação entre a intensidade da atipia coilocitótica e o índice de detecção do vírus através da IMPX.

Todos os casos positivos pela reação imuno-histoquímica eram da variante bowenóide e, embora raros na nossa casuística, todos os três casos da variante simples foram negativos à IMPX.

Também apenas um dos seis carcinomas estágio Ia apresentou positividade pela imuno-histoquímica.

Como o número de casos da variante histológica simples e de carcinoma estágio Ia é pequeno, seria necessário um estudo com maior amostragem para poder afirmar que a variante simples e o carcinoma estágio Ia sejam mais frequentemente negativos do que a variante bowenóide e o VIN III, como relatado na literatura.

A idade foi o único parâmetro que conseguimos correlacionar com a positividade da IMPX, sendo que os casos positivos ocorreram nos grupos etários mais jovens, onde 61,5% das pacientes tinham até 40 anos de idade. Este dado

foi estatisticamente significativa e está de acordo com a literatura embora seja discutível a sua interpretação. Seriam as lesões nas pacientes mais idosas não relacionadas ao vírus ou, pela idade da lesão, o vírus não seria mais detectável através deste método imuno-histoquímico ? Por outro lado, a presença do vírus nas lesões de pacientes mais jovens poderia indicar que a infecção pelo vírus oncogênico poderia acelerar a evolução para o epitélio atípico de grau intenso num menor período de tempo. De qualquer forma, os casos negativos são intrigantes pois do ponto de vista morfológico as lesões são muito semelhantes o que nos faz pensar em fatos inerentes à sensibilidade do próprio método. Assim, estas questões somente poderão ser respondidas através do estudo dos casos negativos com a utilização de uma técnica mais sensível.

Quando se compara a IMPX com o diagnóstico de infecção viral pela citologia ou histologia de rotina, o método morfológico ainda é mais sensível que o da imuno-histoquímica, sendo que neste último, a detecção do capsídeo viral ocorre em cerca de 50% dos casos de condiloma (WILBUR et al., 1988; ROMAN & FIFE, 1989). A IMPX também é menos sensível do que o método de hibridização do DNA (CRUM, 1987; KURMAN et al., 1992b).

Vários fatores estão relacionados com o resultado negativo para a pesquisa do antígeno do capsídeo viral, mesmo na presença dos sinais morfológicos dos efeitos citopáticos virais na lesão, entre eles:

a) amostragem

A positividade da reação é geralmente focal e varia de área para área numa mesma lesão devido à expressão periódica das proteínas virais (FU & REAGAN, 1989; NOFFSINGER et al., 1992).

Quanto maior o número de biópsias, maior o índice de positividade (KURMAN et al., 1981; SYRJÄNEN et al., 1987). Em nosso estudo observamos resultados ora positivos, ora negativos em uma mesma lesão quando repetimos a técnica mais de uma vez.

O índice de detecção depende do tipo de tecido utilizado, da presença de elementos necróticos ou degenerados, da idade da lesão, da presença de tratamento prévio, e do grau de diferenciação do epitélio, com baixo número de partículas virais presentes em epitélios sem diferenciação (KURMAN et al., 1981; FALINI & TAYLOR, 1983; ROMAN & FIFE, 1989; KURMAN et al., 1992b; NOFFSINGER et al., 1992).

b) fixação e processamento do material

A fixação adequada é um fator fundamental na imuno-histoquímica pois pode destruir ou mascarar o antígeno, alterar os detalhes citológicos e histológicos e, interferir com o método de coloração.

São importantes: 1) o tipo de fixador utilizado, sendo ideal o uso de formalina tamponada a 10%; 2) a rapidez na fixação; 3) o tempo de fixação e 4) o pH do fixador (HSU et al., 1981; FALINI & TAYLOR, 1983; FENOGLIO-PREISER et al., 1992).

A alteração em qualquer um dos passos do processamento do material como na desidratação, impregnação, parafinização, microtomia e montagem também pode interferir com a detecção do antígeno do capsídeo viral (BOGOMOLETZ, 1982; ROMAN & FIFE, 1989).

c) técnica da imunoperoxidase

Qualquer um dos passos desta técnica pode alterar a reação como: a limpeza do material utilizado e das soluções sujeitas à manipulação, a diluição

das soluções, as lavagens com tampão, e os reagentes utilizados como a escolha do anticorpo primário (BOGOMOLETZ, 1982).

6.7. Hibridização "in situ"

A positividade foi de 41,7% dos nossos casos e na literatura, a detecção do DNA do HPV em VIN III varia de 40% a 90% (NUOVO et al., 1991; TOKI et al., 1991; KURMAN et al., 1992a), dependendo do método de hibridização utilizado, sendo de cerca de 58% para a hibridização "in situ" (BORNSTEIN et al., 1988; PILOTTI et al., 1989; PARK et al., 1991a; SCHNEIDER et al., 1991).

A idade média dos casos positivos foi de 38,3 anos, sendo mais jovem que as pacientes do grupo negativo onde a idade média foi de 57,9 anos, dado este estatisticamente significativo.

Todos os nossos casos foram positivos para as sondas do HPV 16/18. Em quatro casos (26,7%) houve associação com outros tipos de vírus do HPV na mesma lesão. Isto demonstra a forte correlação entre os HPV 16/18 e a neoplasia intraepitelial vulvar, concordante com a maioria dos trabalhos publicados (SINGER et al., 1985; GUPTA et al., 1987; AMORTEGUI et al., 1990). Quanto à associação de vírus nas lesões, a frequência por nós encontrada está de acordo com a literatura, que relata desde raros casos associados (REID et al., 1987; BUSCEMA et al., 1988; WILBUR et al., 1988) até 31% de infecção viral múltipla (TWIGGS et al., 1988; BECKMANN et al., 1991).

BECKMANN et al. (1991) comentam que a infecção múltipla é mais freqüente na vulva do que no colo uterino. Os tipos virais mais freqüentemente

associados são os 16/18 e 31/35/51, como observado em três dos nossos quatro casos. Pela alta homologia entre o vírus 16 e o 31 é também discutido se esta associação é real ou resultante de uma reação cruzada entre as sondas (NUOVO & RICHART, 1989b).

O DNA viral é detectado em toda a espessura do epitélio a partir da camada parabasal, porém é observado em maior número de células e em maior intensidade nos núcleos das células mais superficiais do epitélio escamoso (CRUM et al., 1982; McDOUGALL et al., 1986; STOLER & BROKER, 1986; BECKMANN et al., 1988; PARK et al., 1991a). Isto deve-se à replicação viral ser limitada a poucas cópias de DNA na camada basal, e à medida que os queratinócitos ascendem para a superfície e se diferenciam, ocorre um aumento do nível de replicação do DNA viral; ou seja, a replicação do DNA e o número de cópias do vírus também estão relacionados com a maturação e diferenciação do epitélio escamoso, assim como a produção das proteínas do capsídeo viral (McDOUGALL et al., 1986; STOLER & BROKER, 1986; SCHNEIDER et al., 1987; PARK et al., 1991a; DEL VECCHIO et al., 1992). O índice de positividade é portanto dependente da sensibilidade inerente ao método empregado e também do grau de diferenciação celular (BECKMANN et al., 1988; AMORTEGUI et al., 1990; SCHNEIDER et al., 1991).

Observamos que a positividade da reação ocorreu em epitélio morfológicamente atípico, e raramente em epitélio normal ou apenas com alterações de condiloma. Isto poderia ser secundário à ausência do DNA do HPV no epitélio normal adjacente ao VIN, ou à presença de pequeno número de cópias do DNA viral, não detectáveis através da hibridização "in situ" (GUPTA et al., 1987; PARK et al., 1991a; FENOGLIO-PREISER et al., 1992).

Embora seja referido na literatura que a presença do DNA do HPV aumente o risco para lesões multifocais e multicêntricas associadas

(BORNSTEIN et al., 1988; TWIGGS et al., 1988; MITCHELL et al., 1993), outros autores não observaram esta relação (BORNSTEIN et al., 1988; JONES et al., 1990; MITCHELL et al., 1993). Os nossos casos positivos pela HIS não foram mais freqüentes nas lesões multifocais e não foram exclusivos de qualquer variante histológica, embora a maioria da amostra fosse constituída pela variante bowenóide. De acordo com JONES et al. (1990), encontramos maior índice de detecção do DNA do HPV em pacientes mais jovens, e aqui também se aplica a mesma discussão proposta para os dados da imuno-histoquímica.

Trabalhos mostram íntima relação entre HIS positiva e a presença de efeitos citopáticos virais no espécime analisado, e que o sucesso da HIS está diretamente relacionada com a presença e o grau de coilocitose na lesão, com estas células mais intensamente coradas (STOLER & BROKER, 1986; GUPTA et al., 1987; FRANQUEMONT et al., 1989; JONES et al., 1990; PARK et al., 1991a).

Entre os quatorze casos que apresentavam coilocitose em grau leve, apenas 14,3% foram positivos pela HIS, igualmente positivos foram 62,5% dos que apresentavam coilocitose moderada e intensa, confirmando através da análise estatística, que a intensidade do efeito citopático produzido pelo vírus está diretamente relacionada com o índice de detecção do DNA do HPV através do método da hibridização "in situ". Porém, nos seis casos em que não havia atipia coilocitótica, o DNA do HPV foi detectado em três deles (50%), sendo um fortemente e dois fracamente positivos pela HIS.

Assim, deve ser enfatizado que a presença de coilocitose está mais associada com a positividade da reação, porém, não indica que será sempre positiva, podendo haver células coilocitóticas negativas, e células normais com DNA do HPV.

A hibridização "in situ" é método mais sensível do que o exame imuno-histoquímico (McCANCE et al., 1985; ROMAN & FIFE, 1989; NUOVO, 1990), e a reação da polimerização em cadeia (PCR) é mais sensível ainda (NAGAI et al., 1987; NUOVO, 1990). Ao contrário da IMPX que requer maturação viral completa para que o sistema de detecção funcione, na hibridização, só a presença do DNA do HPV é suficiente, não sendo necessário o desenvolvimento completo do ciclo biológico viral. Além disso, como as neoplasias intraepiteliais de alto grau são constituídas por uma população celular imatura, há baixa produção de vírus maduro em relação ao conteúdo de DNA viral presente nas células, sendo por isso a HIS mais sensível do que a IMPX (PILOTTI et al., 1989).

Vários fatores estão envolvidos na positividade da reação, dependentes do:

- a) conteúdo do DNA viral que varia de célula para célula numa mesma lesão (STOLER & BROKER, 1986; SCHNEIDER et al., 1987; PILOTTI et al., 1989; ROMAN & FIFE, 1989). Quanto maior o número de fragmentos estudados, maior o índice de positividade,
- b) baixo número de cópias virais na lesão, principalmente nos epitélios atípicos, sendo influenciado pelo grau de sensibilidade do método de hibridização utilizado (HÖFLER, 1987; NAGAI et al., 1987; TWIGGS et al., 1988; JONES et al., 1990; BECKMANN et al., 1991),
- c) tipo de fixador utilizado e o tempo de fixação (McDOUGALL et al., 1986; NUOVO & RICHART, 1989a). A preservação do DNA durante a fixação é um passo importante, sendo ideal a solução de formalina a 10% tamponada, por período de 24 a 48 horas,

d) procedimento da técnica de hibridização

- presença de tipos de HPV na lesão diferentes das sondas utilizadas (WILBUR et al., 1988; NUOVO & RICHART, 1989a; PILOTTI et al., 1989; JONES et al., 1990; BECKMANN et al., 1991),
- acesso da sonda aos ácidos nucleicos (McDOUGALL et al., 1986; HÖFLER, 1987), o qual é influenciado pela concentração e tempo de ação da solução de proteinase K (NUOVO & RICHART, 1989a). Esta enzima altera a morfologia da lesão e provoca o descolamento do tecido se agir por um tempo prolongado (CLAVEL et al., 1991),
- tamanho e tipo da sonda utilizada. As sondas de RNA são mais sensíveis e específicas do que as de DNA (McDOUGALL et al., 1986; HÖFLER, 1987; NAGAI et al., 1987; NUOVO & RICHART, 1989a), assim como as sondas radioativas são mais sensíveis do que as conjugadas à biotina, principalmente quando existe pequeno número de cópias virais na lesão (CLAVEL et al., 1991),
- sistema de detecção escolhido (McDOUGALL et al., 1986; NUOVO & RICHART, 1989a; SYRJÄNEN, 1990): depende da qualidade do material usado (diferentes "Kits" comerciais) (NUOVO & RICHART, 1989a),
- "estringência" da hibridização e das lavagens pós-hibridização (HÖFLER, 1987; NAGAI et al., 1987).

Assim, embora nosso índice de positividade pela HIS seja semelhante ao da literatura, ele foi muito próximo ao encontrado pela IMPX. Isto talvez possa ser explicado por problemas de tempo de fixação não padronizado por ser

um estudo retrospectivo. Além disso, com este estudo introduzimos a HIS no nosso serviço, sendo portanto um método novo, com pequena experiência de manipulação pela equipe que realizou o processo de HIS, necessitando treinamento e adaptações. Embora tenhamos seguido o protocolo estabelecido pelo fabricante, notamos acentuada digestão enzimática dos espécimes, com desintegração de alguns cortes e alto índice de descolamento do tecido. Apesar disso, os exames foram repetidos quando possível, até o desgaste do bloco ou até o esgotamento das soluções fornecidas pelo "Kit".

6.8. Análise conjunta das duas técnicas

Comparando-se as técnicas de IMPX e HIS, foi observada reação positiva através dos dois métodos em cinco casos (13,9%), e para um ou outro em 63,9% dos casos. A baixa concordância dos achados em relação às duas técnicas utilizadas foi interpretada como secundária às alterações inerentes à metodologia utilizada já relatadas anteriormente como possíveis explicações para os resultados negativos na IMPX e HIS. Além disso, a relação entre a replicação viral e a expressão do gene tardio pode variar consideravelmente (CRUM, 1987). Uma outra possibilidade seria a de que os casos positivos pela IMPX e negativos à hibridização "in situ", poderiam conter tipos de vírus diferentes dos utilizados nas sondas. Também, o fato de fazermos cortes seriados para as diferentes reações poderia influenciar a positividade pois a amostragem celular estudada é diferente em cada corte. Além disso, a idade da lesão influencia o índice de detecção do vírus (TWIGGS et al., 1988; FU & REAGAN, 1989), pois com o decorrer do tempo e o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro, a lesão pode reter o DNA do HPV sem promover a síntese de partículas virais maduras. Isto talvez

possa explicar a maior positividade da reação em pacientes mais jovens, que provavelmente têm lesões há menos tempo.

O índice de detecção do HPV através da IMPX ou HIS foi de 63,9%, indicando a complementaridade das reações e estabelecendo assim uma alta associação entre infecção pelo HPV e VIN III e carcinoma estágio Ia da vulva.

O fato da frequência de 83,3% de atipias coilocitóticas ser maior que a frequência de detecção do HPV por qualquer um dos métodos usados poderia ser entendida como decorrente de limitações inerentes aos próprios métodos, que necessitam de determinada quantidade de cópias virais na lesão ou de várias sondas com diferentes tipos de DNA do HPV. Entretanto, apenas o dado morfológico da atipia coilocitótica pode não indicar a presença do vírus na lesão. Apesar de muito relacionada à infecção pelo HPV, a atipia coilocitótica pode ser supervalorizada e daí superdiagnosticada. Devemos reforçar que o diagnóstico histológico criterioso é fundamental, com o conjunto de dados já anteriormente apresentados a fim de que se evite o excesso de diagnóstico de infecção viral.

Devemos destacar também o fato de termos encontrado casos positivos por ambos os métodos entre os carcinomas escamosos estágio Ia, embora em menor número. Isto constata a possibilidade de lesões relacionadas ao vírus se tornarem invasivas na vulva, apesar de serem descritos casos de regressão espontânea. Importante também, é que as lesões de Ca. Ia apresentaram áreas de VIN III adjacentes. Como a idade destas pacientes era cerca de quinze anos mais velha que o grupo de VIN III, muito provavelmente estas lesões tiveram longa evolução e poderiam ter sido anteriormente erradicadas caso o exame periódico da vulva fosse feito rotineiramente.

Os casos negativos também devem ser analisados criticamente. Poderiam realmente não estar relacionados à infecção viral ou, seriam decorrentes das várias limitações de ambos os métodos empregados. Desta forma,

pretendemos, em seguimento a esta linha de trabalho, fazer uma análise detalhada destes casos negativos através de outra técnica com maior sensibilidade.

6.9. O valor da tipagem do HPV

Analisando criticamente os nossos dados, vimos que o HPV está associado às lesões intraepiteliais de grau III da vulva e ao carcinoma escamoso estágio Ia.

Todos os nossos casos positivos apresentaram o DNA do HPV 16/18 pela hibridização "in situ", conhecido pela literatura como tipo de HPV de alto risco para oncogênese. Isto correspondeu a 41,7% dos trinta e seis casos estudados. Além disso, houve associação de tipos virais na mesma lesão, tipos estes conhecidos como de risco baixo ou intermediário para a transformação maligna.

Entendemos que em um trabalho como este, a análise global das características clínicas, histológicas e de detecção do agente infeccioso de uma população, fornece dados muito importantes que contribuirão para o raciocínio do clínico frente a uma paciente isolada.

Entretanto, questionamos o valor da tipagem do DNA viral em exames de rotina, pois a conduta terapêutica deverá ser baseada na gravidade da lesão histológica e não no tipo de vírus presente.

Portanto, se estivermos frente ao quadro histológico de VIN III, concluímos com os dados deste nosso trabalho que muito provavelmente teremos o HPV 16/18 na lesão. Esta paciente deverá ser investigada pesquisando-se a possibilidade de lesões em outros locais do trato genital feminino e acompanhada

periodicamente. Se, por outro lado, a lesão vulvar for de menor intensidade, isto é, VIN I ou VIN II (neoplasia intraepitelial grau I e II, respectivamente), esta paciente também deverá ser seguida pois o encontro de um vírus de menor risco também não garante, em um caso isolado, a potencialidade da transformação maligna.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 7.1. O grupo de estudo compreendeu 36 casos distribuídos em 30 VIN III e seis carcinomas escamosos estágio Ia da vulva. A idade média das pacientes com VIN III foi de 47,5 anos e dos carcinomas estágio Ia, 61,1 anos.
- 7.2. Clinicamente as lesões se apresentaram mais frequentemente como discrômicas e levemente elevadas. Observou-se freqüente associação com lesões em outras regiões do trato genital feminino inferior (69%), predominantemente no colo uterino.
- 7.3. Histologicamente a variante bowenóide foi a mais freqüente (90%), enquanto que o tipo simples, menos comum, ocorreu em apenas 10% dos casos.
- 7.4. Os aspectos histológicos sugestivos de infecção pelo HPV estiveram presentes em 83,3% das lesões, em diferentes graus de intensidade.
- 7.5. A detecção do antígeno do capsídeo viral através da reação de imunoperoxidase ocorreu em 13 casos (36,1%), todos da variante bowenóide.
- 7.6. A detecção do DNA do HPV através da hibridização "in situ" ocorreu em 15 casos (41,7%), tanto da variante histológica bowenóide quanto do tipo simples.

- 7.7. Todos os casos positivos pela hibridização "in situ" apresentaram DNA do HPV 16/18, conhecido como de alto risco oncogênico. Houve associação de diferentes tipos de vírus na mesma lesão em quatro casos (26,7%), relacionados a risco baixo (HPV 6/11) ou intermediário (HPV 31/35/51) na transformação neoplásica, encontrados nas áreas de epitélio atípico.
- 7.8. A positividade dos métodos de detecção não esteve associada à multifocalidade ou multicentricidade das lesões, e nem à presença ou ausência de atipias coloitóticas.
- 7.9. A concordância de dados positivos para ambos os testes foi baixa, em apenas cinco anos (13,9%). Esta baixa concordância sugere que ambos os métodos de detecção do vírus são complementares entre si, e que o uso de um deles não exclui a necessidade de se utilizar o outro.
- 7.10. Se considerarmos a positividade de um ou outro método, a detecção do vírus nas lesões sobe para 63,9%, dado este que aponta para a relação do vírus com as lesões de VIN III e de carcinoma estágio Ia.
- 7.11. A detecção do vírus em ambos os tipos de lesões indica que as neoplasias intraepiteliais vulvares relacionadas ao HPV podem progredir para invasão. Apesar do pequeno número de casos de Ca. Ia estudados, a distribuição dos casos de VIN III em ampla faixa etária sugere que o tempo de evolução da neoplasia intraepitelial grau III parece ser longo, o que permitiria tratá-la precocemente, desde que o exame detalhado da vulva fosse introduzido na rotina do exame ginecológico.

7.12. Os casos positivos detectados por qualquer um dos métodos apresentaram idade média mais jovem do que os casos negativos, dado este estatisticamente significativo e concordante com a literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AMORTEGUI, A.J.; MEYER, M.P.; McINTYRE-SELTMAN, K.; LOCKER, J.
- Detection of human papillomavirus DNA in cervical lesion by in situ hybridization using biotinylated DNA probes. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, 9: 306-15, 1990.
- ATAMDEDE, F. & HOOGERLAND, D. - Regional lymph node recurrence following local excision for microinvasive vulvar carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, 34:125-8, 1989.
- AUBORN, K.J.; WOODWORTH, C. ; DiPAOLO, J.A.; BRADLOW, H.L. - The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. **Int. J.Cancer.**, 49:867-9, 1991.
- BAGGISH, M.S.; SZE, E.H.M.; ADELSON, M.D.; COHN, G.; OATES, R.P. - Quantitative evaluation of the skin and accessory appendages in vulvar carcinoma in situ. **Obstet. Gynecol.**, 74:169-74, 1989.
- BARBERO, M.; MICHELETTI, L.; PRETI, M.; CAVANNA, L.; BOSELI, F.; GARUTI, G.; VALENTINO, M.C.Z.; NICOLACI, P.; GHIRINGHELLO, B.; BORGNO, G. - Vulvar intraepithelial neoplasia: a clinicopathologic study of 60 cases. **J. Reprod. Med.**, 35:1023-8, 1990.
- BARBERO, M.; MICHELETTI, L.; PRETI, M.; VALENTINO, M.C.Z.; NICOLACI, P.; CANNÍ, M.; GHIRINGHELLO, B.; BORGNO, G. - Biologic behavior of vulvar intraepithelial neoplasia: histologic and clinical parameters. **J. Reprod. Med.**, 38:108-12, 1993.
- BARNES, W.; DELGADO, G.; KURMAN, R.J.; PETRILLI, E.S.; SMITH, D.M.; AHMED, S.; LORINCZ, A.T.; TEMPLE, G.F.; JENSON, A.B.; LANCASTER, W.D. - Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, 29:267-73, 1988.

- BECKMANN, A.M.; ACKER, R.; CHRISTIANSEN, A.E.; SHERMAN, K.J. - Human papillomavirus infection in women with multicentric squamous cell neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **165**:1431-7, 1991.
- BECKMANN, A.M.; KIVIAT, N.B.; DALING, J.R.; SHERMAN, K.J.; McDOUGALL, J.K. - Human papillomavirus type 16 in multifocal neoplasia of the female genital tract. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **7**:39-47, 1988.
- BEIGUELMAN, B. - **Curso Prático de Bioestatística**. 2. ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 224p.
- BENEDET, J.L.; WILSON, P.S.; MATISIC, J. - Epidermal thickness and skin appendage involvement in vulvar intraepithelial neoplasia. **J. Reprod. Med.**, **36**:608-12, 1991.
- BERGERON, C.; NAGHASHFAR, Z.; CANAAN, C.; SHAH, K.; FU, Y.; FERENCZY, A. - Human papillomavirus type 16 in intraepithelial neoplasia (bowenoid papulosis) and coexistent invasive carcinoma of the vulva. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **6**:1-11, 1987.
- BERMAN, M.L.; SOPER, J.T.; CREASMAN, W.T.; OLT, G.T.; DiSAIA, P.J. - Conservative surgical management of superficially invasive stage I vulvar carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **35**:352-7, 1989.
- BERNARD, H.U. - Controls in the papillomavirus life cycle. **FEMS Microbiol. Immunol.**, **64**:201-6, 1990.
- BHAWAN, J. - Multicentric pigmented Bowen's disease: a clinically benign squamous cell carcinoma *in situ*. **Gynecol. Oncol.**, **10**:201-5, 1980.
- BOGOMOLETZ, D.W.V. - Immunoperoxidase technique on paraffin sections. Some problems and solutions. **Ann. Pathol.**, **2**:251-4, 1982.
- BORNSTEIN, J.; KAUFMAN, R.H.; ADAM, E.; ADLER-STORTHZ, K. - Multicentric intraepithelial neoplasia involving the vulva: clinical features and association with human papillomavirus and herpes simplex virus. **Cancer**, **62**:1601-4, 1988.
- BRANDENBERGER, A.M.; RÜDLINGER, R.; HÄNGGI, W.; BERSINGER, N.A.; DREHER, E. - Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma. A study by in situ hybridization. **Arch. Gynecol. Obstet.**, **252**:31-5, 1992.

- BROWN, D.R. & FIFE, K.H. - Human papillomavirus infections of the genital tract. **Med. Clin. North. Am.**, 74:1455-85, 1990.
- BUCKLEY, C.H.; BUTLER, E.B.; FOX, H. - Vulvar intraepithelial neoplasia and microinvasive carcinoma of the vulva. **J. Clin. Pathol.**, 37:1201-11, 1984.
- BUSCEMA, J.; NAGHASHFAR, Z.; SAWADA, E.; DANIEL, R.; WOODRUFF, J.D.; SHAH, K. - The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, 71:601-6, 1988.
- BUSCEMA, J. & WOODRUFF, J.D. - Progressive histobiologic alterations in the development of vulvar cancer. Report of five cases. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 138:146-50, 1980.
- CASAS-CORDERO, M.; MORIN, C.; ROY, M.; FORTIER, M.; MEISELS, A. - Origin of the koilocyte in condylomata of the human cervix. Ultrastructural study. **Acta Cytol.**, 25:383-92, 1981.
- CHAFE, W.; RICHARDS, A.; MORGAN, L.; WILKINSON, E. - Unrecognized invasive carcinoma in vulvar intraepithelial neoplasia (VIN). **Gynecol. Oncol.**, 31:154-62, 1988.
- CLAVEL, C.; BINNINGER, I.; BOUTTERIN, M.C.; POLETTE, M.; BIREMBAUT, P. - Comparison of four non-radioactive and ³³S-based methods for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization. **J. Virol. Methods**, 33:253-66, 1991.
- COGHLAN, J.P.; ALDRED, P.; HARALAMBIDIS, J.; NIAL, H.D.; PENSCHOW, J.D.; TREGGAR, G.W. - Review: hybridization histochemistry. **Anal. Biochem.**, 149:1-28, 1985.
- CROOK, T. & VOUSDEN, K.H. - Properties of p53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. **EMBO J.**, 11:3935-40, 1992.
- CRUM, C.P. - Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. **Obstet. Gynecol.**, 79:448-54, 1992.

- CRUM, C.P. - Vulvar intraepithelial neoplasia: histology and associated viral changes. In: WILKINSON, E.J., ed. - **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 79-101. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).
- CRUM, C.P. - Vulvar intraepithelial neoplasia: the concept and its application. **Hum. Pathol.**, **13**:187-9, 1982.
- CRUM, C.P.; BRAUN, L.A.; SHAH, K.V.; FU, Y.S.; LEVINE, R.U.; FENOGLIO, C.M.; RICHART, R.M.; TOWNSEND, D.E. - Vulvar intraepithelial neoplasia: correlation of nuclear DNA content and the presence of a human papilloma virus (HPV) structural antigen. **Cancer**, **49**: 468-71, 1982.
- CRUM, C.P. & BURKETT, B.J. - Papillomavirus and vulvovaginal neoplasia. **J. Reprod. Med.**, **34**(suppl. 8): 566-71, 1989.
- CRUM, C.P.; LISKOW, A.; PETRAS, P.; KENG, W.C.; FRICK, H.C., II. - Vulvar intraepithelial neoplasia (severe atypia and carcinoma *in situ*): a clinicopathologic analysis of 41 cases. **Cancer**, **54**:1429-34, 1984.
- DAS, B.C.; SHARMA, J.K.; GOPALAKRISHNA, V.; LUTHRA, U.K. - Analysis polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. **J. Gen. Virol.**, **73**:2327-36, 1992.
- DEFEO-JONES, D.; VUOCOLO, G.A.; HASKELL, K.M.; HANOBİK, M.G.; KIEFER, D.M.; McAVOY, E.M.; IVEY-HOYLE, M.; BRANDSMA, J.L.; OLIFF, A.; JONES, R.E. - Papillomavirus E7 protein binding to the retinoblastoma protein is not required for viral induction of warts. **J. Virol.**, **67**:716-25, 1993.
- DEL VECCHIO, A.M.; ROMANCZUK, H.; HOWLEY, P.M.; BAKER, C.C. - Transient replication of human papillomavirus DNAs. **J. Virol.**, **66**:5949-58, 1992.
- DE VILLIERS, E.M. - Heterogeneity of the human papillomavirus group. **J. Virol.**, **63**:4898-903, 1989.
- DI LUCA, D.; ROTOLA, A.; PILOTTI, S.; MONINI, P.; CASELLI, E.; RILKE, F.; CASSAI, E. - Simultaneous presence of herpes simplex and human papiloma virus sequences in human genital tumors. **Int. J. Cancer**, **40**:763-8, 1987.

- DUGGAN, M.A.; BORAS, V.F.; IVOUE, M.; MCGREGOR, S.E.; ROBERTSON, D.I. - Human papillomavirus DNA determination of anal condylomata, dysplasias, and squamous carcinomas with *in situ* hybridization. **Am. J. Clin. Pathol.**, 92:16-21, 1989.
- FALINI, B. & TAYLOR, C.R. - New developments in immunoperoxidase techniques and their application. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 107:105-17, 1983.
- FENOGLIO-PREISER, C.M.; LISTROM, M.B.; BLUME, P. - The use of immunohistochemistry: present and future. In: FENOGLIO-PREISER, C.M.; WOLFF, M.; RILKE, F., ed. - **Progress in surgical pathology**. USA, FIELD & WOOD, 1992. p. 1-30, V. XII.
- FLETCHER, S. - Histopathology of papiloma virus infection of the cervix uteri: the history, taxonomy, nomenclature and reporting of koilocytic dysplasias. **J. Clin. Pathol.**, 36:616-24, 1983.
- FRANQUEMONT, D.W.; WARD, B.E.; ANDERSEN, W.A.; CRUM, C.P. - Prediction of "high-risk" cervical papillomavirus infection by biopsy morphology. **Am. J. Clin. Pathol.**, 92:577-82, 1989.
- FU, Y.S. & REAGAN, J.W. - **Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1989. 397p. (Major Problems in Pathology, 21).
- FUJITA, M.; INOUE, M.; TANIZAWA, O.; IWAMOTO, S.; ENOMOTO, T. - Alterations of the *p53* gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. **Cancer Res.**, 52:5323-8, 1992.
- FUKUSHIMA, M.; YAMAKAWA, Y.; SHIMANO, S.; HASHIMOTO, M.; SAWADA, Y.; FUJINAGA, K. - The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer**, 66:2155-61, 1990.
- GISSMANN, L. - Linking HPV to cancer. **Clin. Obstet. Gynecol.**, 32:141-7, 1989.
- GRIEP, A.E.; HERBER, R.; JEON, S.; LOHSE, J.K.; DUBIELZIG, R.R.; LAMBERT, P.F. - Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. **J. Virol.**, 67:1373-84, 1993.

- GUPTA, J.; PILOTTI, S.; RILKE, F.; SHAH, K. - Association of human papillomavirus type 16 with neoplastic lesions of the vulva and other genital sites by *in situ* hybridization. **Am. J. Pathol.**, **127**:206-15, 1987.
- HACKER, N.F. & VAN DER VELDEN, J. - Conservative management of early vulvar cancer. **Cancer**, **71** (suppl. 4): 1673-7, 1993.
- HALBERT, C.L.; DEMERS, G.W.; GALLOWAY, D.A. - The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J. Virol.**, **65**:473-8, 1991.
- HASHIDA, T. & YASUMOTO, S. - Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. **J. Gen. Virol.**, **72**:1569-77, 1991.
- HIGGS, T.W.; MOORE, N.J.; BADAWI, D.Y.; TAUB, F.E. - Type - specific human papillomavirus detection in formalin-fixed, paraffin - embedded tissue sections using nonradioactive deoxyribonucleic acid probes. **Lab. Invest.**, **63**:557-67, 1990.
- HÖFLER, H. - What's new in "*in situ* hybridization". - **Pathol. Res. Pract.**, **182**:421-30, 1987.
- HØRDLING, U.; DAUGAARD, S.; IVERSEN, A.K.N.; KNUDSEN, J.; BOCK, J.E.; NORRILD, B. - Human papillomavirus type 16 in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and associated cervical neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, **42**:22-6, 1991.
- HOWLEY, P.M. - The human papillomaviruses. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **106**:429-32, 1982.
- HOWLEY, P.M. & SCHLEGEL, R. - The human papillomaviruses. An overview. **Am. J. Med.**, **85**(suppl. 2a):155-8, 1988.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. - The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**: 816-21, 1981.
- HUSSEINZADEH, N.; NEWMAN, N.J.; WESSELER, T.A. - Vulvar intraepithelial neoplasia: a clinicopathological study of carcinoma *in situ* of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, **33**:157-63, 1989.

- JEWERS, R.J.; HILDEBRANDT, P.; LUDLOW, J.W.; KELL, B.; McCANCE, D.J. - Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. **J. Virol.**, **66**:1329-35, 1992.
- JONES, R.W.; PARK, J.S.; McLEAN, M.R.; SHAH, K.V. - Human papillomavirus in women with vulvar intraepithelial neoplasia III. **J. Reprod. Med.**, **35**:1124-6, 1990.
- KELLEY, J.L., III; BURKE, T.W.; TORNOS, C.; MORRIS, M.; GERSHENSON, D.M.; SILVA, E.G.; WHARTON, J.T. - Minimally invasive vulvar carcinoma: an indication for conservative surgical therapy. **Gynecol. Oncol.**, **44**:240-4, 1992.
- KIMURA, S. & MASUDA, M. - A comparative immunoperoxidase and histopathologic study of *condylomata acuminata*. **J. Cutan. Pathol.**, **12**:142-6, 1985.
- KIYABU, M.T.; SHIBATA, D.; ARNHEIM, N.; MARTIN, W.J.; FITZGIBBONS, P.L. - Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. **Am. J. Surg. Pathol.**, **13**:221-4, 1989.
- KLEINHEINZ, A.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; CRIPE, T.P.; TUREK, L.P.; GISSMANN, L. - Human papillomavirus early gene products and maintenance of the transformed state of cervical cancer cells in vitro. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **144**:175-9, 1989.
- KLUZAK, T.R. & KRAUS, F.T. - Condylomata, papillomas, and verrucous carcinomas of the vulva and vagina. In: WILKINSON, E.J., ed. - **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p. 49-77. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9).
- KORHONEN, M.O.; KAUFMAN, R.H. ROBERTS, D.; WALKER, N., ADAM, E. - Carcinoma in situ of the vulva: the search for viral particles. **J. Reprod. Med.**, **27**:746-8, 1982.
- KOUTSKY, L.A.; GALLOWAY, D.A.; HOLMES, K.K. - Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Epidemiol. Rev.**, **10**:122-63, 1988.
- KREBS, H.B. - Management strategies. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **32**:200-13, 1989a.

- KREBS, H.B. - Milestones in HPV research. **Clin. Obstet. Gynecol.**, 32:107-11, 1989b.
- KURMAN, R.J.; NORRIS, H.J.; WILKINSON, E.J. - Human papillomaviruses and cancer of the lower female genital tract. In: _____ - **Tumors of the cervix, vagina, and vulva**. 3. ed. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1992a. p. 19-28. (Atlas of Tumor Pathology, 4).
- KURMAN, R.J.; NORRIS, H.J.; WILKINSON, E.J. - Tumors of the vulva. In: _____ - **Tumors of the cervix, vagina, and vulva**. 3. ed. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1992b. p. 179-255. (Atlas of Tumor Pathology, 4).
- KURMAN, R.J.; SHAH, K.H.; LANCASTER, W.D.; JENSON, A.B. - Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 140:931-5, 1981.
- KURMAN, R.J.; TOKI, T.; SCHIFFMAN, M.H. - Basaloid and warty carcinomas of the vulva: distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. **Am. J. Surg. Pathol.**, 17:133-45, 1993.
- KYO, S.; INOUE, M.; NISHIO, Y.; NAKANISHI, K.; AKIRA, S.; INOUE, H.; YUTSUDA, M.; TANIZAWA, O.; HAKURA, A. - NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. **J. Virol.**, 67:1058-66, 1993.
- LUCAS, V.A. - Human papillomavirus infection: a potentially carcinogenic sexually transmitted disease (condylomata acuminata, genital warts). **Nurs. Clin. North Am.**, 23:917-35, 1988.
- McCANCE, D.J.; CLARKSON, P.K.; DYSON, J.L.; WALKER, P.G.; SINGER, A. - Human papillomavirus types 6 and 16 in multifocal intraepithelial neoplasias of the female lower genital tract. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, 92:1093-100, 1985.
- McDOUGALL, J.K.; MYERSON, D.; BECKMANN, A.M. - Detection of viral DNA and RNA by in situ hybridization. **J. Histochem. Cytochem.**, 34:33-8, 1986.
- MILDE-LANGOSCH, K.; BECKER, G.; LÖNING, T. - Human papillomavirus and *c-myc/c-erb* B2 in uterine and vulvar lesions. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, 419:479-85, 1991.

- MITCHELL, M.F.; PRASAD, C.J.; SILVA, E.G.; RUTLEDGE, F.N.; McARTHUR, M.C.; CRUM, C.P. - Second genital primary squamous neoplasms in vulvar carcinoma: viral and histopathologic correlates. **Obstet. Gynecol.**, **81**:13-8, 1993.
- MITTAL, K. - Epidermal growth factor receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **166**:1593, 1992. [Letter]
- MITTAL R.; TSUTSUMI, K.; PATER, A.; PATER, M.M. - Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. **Obstet. Gynecol.**, **81**:5-12, 1993.
- MORELLI, A.E.; SANANES, C.; Di PAOLA, G.; PAREDES, A.; FAINBOIM, L. - Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans' cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. **Am. J. Clin. Pathol.**, **99**:200-6, 1993.
- MORIN, C.; BRAUN, L.; CASAS-CORDERO, M.; SHAH, K.V.; ROY, M.; FORTIER, M.; MEISELS, A. - Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase - antiperoxidase technique. **J. Natl. Cancer Inst.**, **66**:831-5, 1981.
- NAGAI, N.; NUOVO, G.; FRIEDMAN, D.; CRUM, C.P. - Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the in situ hybridization technique. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **6**:366-79, 1987.
- NAIR, B.S. & PILLAI, R. - Oncogenesis of squamous carcinoma of the uterine cervix. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **11**:47-57, 1992.
- NOFFSINGER, A.; WITTE, D.; FENOGLIO-PREISER, C.M. - The relationship of human papillomaviruses to anorectal neoplasia. **Cancer**, **70**(suppl.5):1276-87, 1992.
- NOUMOFF, J.S. & FARBER, M. - Tumors of the vulva. **Int. J. Dermatol.**, **25**:552-63, 1986.
- NUOVO, G.J. - Human papillomavirus DNA in genital tract lesions histologically negative for condylomata: analysis by *in situ*, Southern blot hybridization and the polymerase chain reaction. **Am. J. Surg. Pathol.**, **14**:643-51, 1990.

- NUOVO, G.J.; DELVENNE, P.; MacCONNELL, P.; CHALAS, E.; NETO, C.; MANN, W.J. - Correlation of histology and detection of human papillomavirus DNA in vulvar cancers. **Gynecol. Oncol.**, **43**:275-80, 1991.
- NUOVO, G.J. & RICHART, R.M. - A comparison of different *in situ* hybridization methodologies (biotin-based and ³⁵S-based) for the detection of human papillomavirus DNA. **Lab. Invest.**, **61**:471-6, 1989a.
- NUOVO, G.J. & RICHART, R.M. - A comparison of slot blot, Southern blot, and *in situ* hybridization analyses for human papillomavirus DNA in genital tract lesions. **Obstet. Gynecol.**, **74**:673-8, 1989b.
- PARK, J.S.; JONES, R.W.; McLEAN, M.R.; CURRIE, J.L.; WOODRUFF, J.D.; SHAH, K.V.; KURMAN, R.J.- Possible etiologic heterogeneity of vulvar intraepithelial neoplasia: a correlation of pathologic characteristics with human papillomavirus detection by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. **Cancer**, **67**:1599-607, 1991a.
- PARK, J.S.; RADER, J.S.; WU, T.C.; LAIMINS, L.A.; CURRIE, J.L.; KURMAN, R.J.; SHAH, K.V. - HPV -16 viral transcripts in vulvar neoplasia: preliminary studies. **Gynecol.Oncol.**, **42**:250-5, 1991b.
- PATTERSON, J.W.; KAO, G.F.; GRAHAM, J.H.; HELWIG, E.B.- Bowenoid papulosis: a clinicopathologic study with ultrastructural observations. **Cancer**, **57**:823-36, 1986.
- PHELPS, W.C.; MÜNGER, K.; YEE, C.L.; BARNES, J.A.; HOWLEY, P.M. - Structure - function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **J. Virol.**, **66**:2418-27, 1992.
- PICH, A.; MARGARIA, E.; GHIRINGHELLO, B.; NAVONE, R. - *In situ* hybridization for human papillomavirus as a method of predicting the evolution of cervical intraepithelial neoplasia. **Arch. Gynecol.Obstet.**, **252**:11-9, 1992.

- PILOTTI, S.; GUPTA, J.; STEFANON, B.; DE PALO, G.; SHAH, K.V.; RILKE, F. - Study of multiple human papillomavirus - related lesions of the lower female genital tract by in situ hybridization. **Hum. Pathol.**, **20**:118-23, 1989.
- PLANNER, R.S. & HOBBS, J.B. - Intraepithelial and invasive neoplasia of the vulva in association with human papillomavirus infection. **J. Reprod. Med.**, **33**:503-9, 1988.
- PODCZASKI, E.; SEXTON, M.; KAMINSKI, P.; SINGAPURI, K.; SOROSKY, J.; LARSON, J.; MORTEL, R. - Recurrent carcinoma of the vulva after conservative treatment for "microinvasive" disease. **Gynecol. Oncol.**, **39**:65-8, 1990.
- POWELL, L.C., Jr.; DINH, T.V.; RAJARAMAN, S.; HANNIGAN, E. V.; DILLARD, E.A., Jr.; YANDELL, R.B.; TO, T. - Carcinoma *in situ* of the vulva: a clinicopathologic study of 50 cases. **J. Reprod. Med.**, **31**:808-14, 1986.
- PRAT, J. - Pathology of vulvar intraepithelial lesions and early invasive carcinoma. **Hum. Pathol.**, **22**:877-83, 1991.
- RAGNARSSON, B., RAABE, N.; WILLEMS, J.; PETTERSSON, F. - Carcinoma *in situ* of the vulva - long term prognosis. **Acta Oncol.**, **26**:277-80, 1987.
- RANDO, R.F.- Human papillomavirus: implications for clinical medicine. **Ann. Intern. Med.**, **108**:628-30, 1988.
- REID, R. & GREENBERG, M.D. - Human papillomavirus - related diseases of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **34**:630-50, 1991.
- REID, R.; GREENBERG, M.D.; JENSON, A. B.; HUSAIN, M.; WILLETT, J.; DAOUD, Y.; TEMPLE, G.; STANHOPE, C.R.; SHERMAN, A.I.; PHIBBS, G.D.; LORINCZ, A.T. - Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. **Am. J.Obstet. Gynecol.**, **156**:212-22, 1987.
- ROMAN, A. & FIFE, K.H. - Human papillomaviruses: are we ready to type? **Clin. Microbiol. Rev.**, **2**:166-90, 1989.

- RUBINSTEIN, E. - Probably virus - induced epithelial lesions in preinvasive cervical cancer. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, 59:529-34, 1980.
- RUEDA-LEVERONE, N.G.; DI PAOLA, G.R.; MEISS, R.P.; VIGHI, S.G.; LLAMOSAS, F. - Association of human papillomavirus infection and vulvar intraepithelial neoplasia: a morphological and immunohistochemical study of 30 cases. **Gynecol. Oncol.**, 26:331-9, 1987.
- RUSK, D.; SUTTON, G.P.; LOOK, K.Y.; ROMAN, A. - Analysis of invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vulvar intraepithelial neoplasia for the presence of human papillomavirus DNA. **Obstet. Gynecol.**, 77:918-22, 1991.
- RUTLEDGE, F.N.; MITCHELL, M.F.; MUNSELL, M.F.; ATKINSON, E.N.; BASS, S.; MCGUFFEE, V.; SILVA, E. - Prognostic indicators for invasive carcinoma of the vulva. **Gynecol. Oncol.**, 42:239-44, 1991.
- SATO, S.; OKAGAKI, T.; CLARK, B.A.; TWIGGS, L.B.; FUKUSHIMA, M.; OSTROW, R.S.; FARAS, A.J. - Sensitivity of koilocytosis, immunocytochemistry, and electron microscopy as compared to DNA hybridization in detecting human papillomavirus in cervical and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, 5:297-307, 1986.
- SCHEFFNER, M.; TAKAHASHI, T.; HUIBREGTSE, J.M.; MINNA, J.D.; HOWLEY, P.M. - Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. **J. Virol.**, 66:5100-5, 1992.
- SCHNEIDER, V. - Microscopic diagnosis of HPV infection. **Clin. Obstet. Gynecol.**, 32:148-56, 1989.
- SCHNEIDER, A. & GRUBERT, T. - Diagnosis of HPV infection by recombinant DNA technology. **Clin. Obstet. Gynecol.**, 32:127-40, 1989.
- SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; KIRCHMAYR, R.; SCHNEIDER, V. - Prevalence of human papillomavirus genomes in tissue from the lower genital tract as detected by molecular in situ hybridization. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, 10:1-14, 1991.

- SCHNEIDER, A.; OLTERSDORF, T.; SCHNEIDER, V.; GISSMANN, L. - Distribution pattern of human papilloma virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular *in situ* hybridization of tissue sections. **Int. J. Cancer**, **39**:717-21, 1987.
- SEDLACEK, T.V.; SEDLACEK, A.E.; NEFF, D.K.; RANDO, R.F. - The clinical role of human papilloma virus typing. **Gynecol.Oncol.**, **42**:222-6, 1991.
- SEHGAL, V.N.; KORANNE, R.V.; SRIVASTAVA, S.B. - Genital warts: current status. **Int. J. Dermatol.**, **28**:75-85, 1989.
- SEYDA, M.; SCHEELE, T.; NEUMANN, R.; KRUEGER, G.R.F. - Comparative evaluation of non-radioactive *in situ* hybridization techniques for pathologic diagnosis of viral infection. **Pathol. Res. Pract.**, **184**:18-26, 1989.
- SHAFI, M.I.; LUESLEY, D.M.; BYRNE, P.; SAMRA, J.S.; REDMAN, C.W.; JORDAN, J.A.; ROLLASON, T.P. - Vulval intraepithelial neoplasia - management and outcome. **Br.J. Obstet. Gynaecol.**, **96**:1339-44, 1989.
- SIEGSMUND, M.; WAYSS, K.; AMTMANN, E. - Activation of latent papillomavirus genomes by chronic mechanical irritation. **J. Gen. Virol.**, **72**:2787-9, 1991.
- SINGER, A.; CAMPION, M.J.; McCANCE, D.J. - Human papillomavirus. **Br. J. Hosp. Med.**, **34**:104-8, 1985.
- SINGER, A. & McCANCE, D.J. - The wart virus and genital neoplasia; a casual or causal association. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **92**:1083-5, 1985.
- SMOTKIN, D. - Virology of human papillomavirus. **Clin.Obstet. Gynaecol.**, **32**:117-26, 1989.
- SMOTKIN, D.; PROKOPH, H.; WETTSTEIN, F.O. - Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. **J.Virol.**, **63**:1441-7, 1989.
- SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; SCHRIJNEMAKERS, H.F.J.; SNOW, G.B.; WALBOOMERS, J.M.M. - Human papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA. **J. Gen. Virol.**, **73**:2059-66, 1992.

- SPITZER, M.; CHERNYS, A.E.; HIRSCHFIELD, L.; SPIEGEL, G.; SEDLIS, A.; ZUNA, R.E.; STEINBERG, B.; BRANDSMA, J.L.; KRUMHOLZ, B.A. - Assessment of criteria used in the histologic diagnosis of human papillomavirus - related disease of the female lower genital tract. **Gynecol. Oncol.**, **38**:105-9, 1990.
- STOLER, M.H. & BROKER, T.R. - In situ hybridization of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and cervical carcinoma. **Hum. Pathol.**, **17**:1250-8, 1986.
- SUGASE, M.; MORIYAMA, S.; HATA, S.; MATSUKURA, T. - Detection of human papillomavirus type 16 DNA and papillomavirus genus- specific antigens in vulva and cervix from patients with bowenoid papulosis. **Jpn. J. Cancer Res.**, **80**:19-23, 1989.
- SYRJÄNEN, K.J. - Genital human papillomavirus (HPV) infections and their association with squamous cell cancer: reappraisal of the morphologic, epidemiologic and DNA data. In: FENOGLIO-PREISER, C.M.; WOLFF, M.; RILKE, F., eds - **Progress in surgical pathology**. USA, Field & Wood, 1992. p.217-39. V. XII.
- SYRJÄNEN, S.M. - Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infections. Review article. **APMIS**, **98**:95-110, 1990.
- SYRJÄNEN, K.; GISSMANN, L.; KOSS, L.G., eds. - **Papillomaviruses and human disease**. Berlin, Springer-Verlag, 1987. 518p.
- SYRJÄNEN, K.J. & PYRHÖNEN, S. - Demonstration of human papilloma virus antigen in the condylomatous lesions of the uterine cervix by immunoperoxidase technique. **Gynecol. Obstet. Invest.**, **14**:90-6, 1982.
- SYRJÄNEN, K. & SYRJÄNEN, S. - Epidemiology of human papilloma virus infections and genital neoplasia. **Scand. J. Infect. Dis.**, (suppl.69):7-17, 1990.
- TAYLOR, D.R., Jr. & SOUTH, D.A. - Bowenoid papulosis: a review. **Cutis**, **27**:92-8, 1981.

- TOKI, T.; KURMAN, R.J.; PARK, J.S.; KESSIS, T.; DANIEL, R.W.; SHAH, K.V. - Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. **Int.J.Gynecol.Pathol.**, **10**:107-25, 1991.
- TWIGGS, L.B.; OKAGAKI, T.; CLARK, B.; FUKUSHIMA, M.; OSTROW, R.; FARAS, A. - A clinical, histopathologic, and molecular biologic investigation of vulvar intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **7**:48-55, 1988.
- VANDE POL, S.B. & HOWLEY, P.M. - The bovine papillomavirus constitutive enhancer is essential for viral transformation, DNA replication, and the maintenance of latency. **J. Virol.**, **66**:2346-58, 1992.
- VILLA, L.L. & BRENTANI, R.R. - Human papillomavirus up-date. **Int.J. Cancer**, **48**:163-6, 1991.
- WADE, T.R.; KOPF, A.W.; ACKERMAN, A.B. - Bowenoid papulosis of the penis. **Cancer**, **42**:1890-903, 1978.
- WADE, T.R.; KOPF, A.W.; ACKERMAN, A.B. - Bowenoid papulosis of the genitalia. **Arch. Dermatol.**, **115**:306-8, 1979.
- WAGGONER, S.E.; WOODWORTH, C.D.; STOLER, M.H.; BARNES, W.A.; DELGADO, G.; Di PAOLO, J.A. - Human cervical cells immortalized *in vitro* with oncogenic human papillomavirus DNA differentiate dysplastically *in vivo*. **Gynecol. Oncol.**, **38**:407-12, 1990.
- WELLS, M.; GRIFFITHS, S.; LEWIS, F.; BIRD, C.C. - Demonstration of human papillomavirus types in paraffin processed tissue from human anogenital lesions by *in situ* DNA hybridization. **J. Pathol.**, **152**:77-82, 1987.
- WILBUR, D.C.; REICHMAN, R.C.; STOLER, M.H. - Detection of infection by human papillomavirus in genital condylomata: a comparison study using immunocytochemistry and *in situ* nucleic acid hybridization. **Am. J. Clin. Pathol.**, **89**:505-10, 1988.
- WILCZYNSKI, S.P.; BERGEN, S.; WALKER, J.; LIAO, S.Y.; PEARLMAN, L.F. - Human papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. **Hum. Pathol.**, **19**:697-704, 1988.

- WILKINSON, E.J. - Superficial invasive carcinoma of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **28**:188-95, 1985.
- WILKINSON, E.J. - Superficially invasive carcinoma of the vulva. In: _____ - **Pathology of the vulva and vagina**. New York, Churchill Livingstone, 1987. p.103-17. (Contemporary Issues in Surgical Pathology, 9)
- WILKINSON, E.J. - Superficially invasive carcinoma of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **34**:651-61, 1991.
- WILKINSON, E.J. - The 1989 Presidential Address: International Society for the Study of Vulvar Disease. **J. Reprod. Med.**, **35**:981-91, 1990.
- WILKINSON, E.J.; KNEALE, B.; LYNCH, P.J. - Report of the ISSVD Terminology Committee. **J. Reprod. Med.**, **31**:973-4, 1986.
- WOODRUFF, J.D. - Carcinoma in situ of the vulva. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **34**:669-76, 1991.
- WOODRUFF, J.D.; BRAUN, L.; CAVALIERI, R.; GUPTA, P.; PASS, F.; SHAH, K.V. - Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from the female genital tract. **Obstet. Gynecol.**, **56**, 727-32, 1980.
- WRIGHT, T.C. & RICHART, R.M. - Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. **Gynecol. Oncol.**, **37**:151-64, 1990.
- YUN, K.; MOLENAAR, A.J.; WILKINS, R.J. - Detection of human papillomavirus DNA in cervical lesions by in situ DNA hybridization. **Pathology**, **21**:1-4, 1989.
- ZUCKER, P.K. & BERKOWITZ, R.S. - The tissue of microinvasive squamous cell carcinoma of the vulva: an evaluation of the criteria of diagnosis and methods of therapy. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **40**:136-43, 1985.
- ZUR HAUSEN, H. - Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? **Lancet**, **2**:1370-2, 1982.
- ZUR HAUSEN, H. - Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. **Virology**, **184**:9-13, 1991.

ZUR HAUSEN, H. - Intracellular surveillance of persisting viral infections: human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. **Lancet**, **2**:489-91, 1986.

ZUR HAUSEN, H. - Papillomaviruses in human cancer. **Cancer**, **59**:1692-6, 1987.

* HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1990. 45p.

ANEXO

RELAÇÃO GLOBAL DOS DADOS ENCONTRADOS

Nº DO CASO	IDADE	MATE-RIAL	DOENÇA TRAT.GEN FEM. BAIXO ASSOC.	ASPECTOS CLIN. OU MACROSC. DAS LESÕES	LOCALIZA-ÇÃO DAS LESÕES	FOCALI-DADE DAS LESÕES	DIAG. HISTOL. E PROF. DE INVASAO	VARIANTE HISTOLÓ-GICA	AK ASSOCIA-DA	EXTENSÃO PARA ANEXOS	ALT. EPITELIAIS ADJACEN-TES	IMPX	HIS E TIPO DO HPV PRESENTE
1	39	VS	N	N	Peq. lábio D e E	MU	VIN III	S	+	gl. mucosas e pêlos	-	-	- (*)
2	52	B	Carcinoma colo Ec III	Veget. e hiperocrômica	N	UN	VIN III	bw	+	-	-	+	-
3	33	B	N	pápulas discrômicas	N	N	VIN III	bw	-	gl. sebáceas e pêlos	hiperplasia escamosa	-	+ 16/18
4	15	B	Gestante CO III	N	fúrcula	UN	VIN III	bw	+++	N	-	-	++ 16/18
5	40	VR	VIN III anterior	hipercrômica e ulceradas	clitóris, peq. e gde lábio D e E	UN extenso	Ca. Ia. 0,23mm	bw	++	gl. mucosas	-	+	+ 16/18 ++31/35/51
6	50	B	VIN III há 20 anos	pápulas hiper e hipocrômicas	períneo	MU	VIN III	bw	+	pêlos	hiperplasia escamosa	-	-
7	18	B	Condiloma, molusco contagioso CO III	pápulas hiperocrômi-cas	grande lábio D	UN	VIN III	bw	-	-	-	+	+++ 16/18
8	82	B	VIN III anterior	discromia	N	UN	VIN III	bw	+	N	-	+	-
9	68	VR	Carcinoma epidermóide vagina	N	períneo	MU	Ca. Ia. 0,23mm	bw	++	pêlos	-	-	-
10	17	B	N	verrucosas	N	MU	VIN III	bw	+++	-	-	+++	6/11 e (**) 16/18

RELAÇÃO GLOBAL DOS DADOS ENCONTRADOS (continuação)

Nº DO CASO	IDADE	MATERIAL	DOENÇA TRAT.GEN FEM. BAIXO ASSOC.	ASPECTOS CLIN. OU MACROSC. DAS LESÕES	LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES	FOCALIDADE DAS LESÕES	DIAG. HISTOL. E PROF. DE INVASÃO	VARIANTE HISTOLÓGICA	AK ASSOCIADA	EXTENSÃO PARA ANEXOS	ALT. EPITELIAIS ADJACENTES	IMPX	HIS E TIPO DO HPV PRESENTE
11	67	VP	VIN III anterior e cond. vulvar	discromia	fúrcula	UN	VIN III	bw	-	-	-	-	-
12	43	B	sífilis e tricomoníase e tratados; AK colo	vegetante e hiperocrômica	grandes lábios D e E	MU	VIN III	bw	++	-	-	+	-
13	44	B	tumor recidivante da vulva	N	peq. lábio D e fúrcula	MU	VIN III	S	-	N	-	-	+ 16/18
14	28	B	N	verrucosa	N	UN	VIN III	bw	+	-	-	++	-
15a	47	B	N	hipocrômica	grande lábio D	N	Ca. la. 0,47mm	bw	-	pêlos	-	-	-
16a	47	VP	CIN III c/ condiloma	pápulas hipocrômicas	peq. e gde. lábio D	UN extenso	VIN III	bw	+	pêlos e gl. sebáceas	-	+	-
17	82	B	N	N	fúrcula	UN	Ca. la. 0,37mm	bw	+	N	-	-	-
18	74	B	N	exofítica ulcerada	peq. e gde. lábio D	UN extenso	VIN III	bw	+	N	Carcinoma epidermóide c/ VIN III associado	-	-
19b	32	B	N	verruosas hiper e hipocrômicas	paracitórís peq. e gde. lábio D, períneo	MU	VIN III	bw	++	pêlos	-	+	+ 16/18
20b	38	B	VIN III há 5 anos	área Collins (+)	clitórís gde lábio D	MU	VIN III	bw	+	-	carcinoma epidermóide c/ VIN III associado	-	+++16/18

RELAÇÃO GLOBAL DOS DADOS ENCONTRADOS (continuação)

Nº DO CASO	IDADE	MATE-RIAL	DOENÇA TRAT.GEN FEM. BAIXO ASSOC.	ASPECTOS CLIN. OU MACROSC. DAS LESÕES	LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES	FOCALIDADE DAS LESÕES	DIAG. HISTOL. E PROF. DE INVASÃO	VARIANTE HISTOLÓGICA	AK ASSOCIADA	EXTENSÃO PARA ANEXOS	ALT. EPITELIAIS ADJACENTES	IMPX	HIS E TIPO DO HPV PRESENTE
21 ^b	38	VR	N	hipocromia	peq e gde lábio D e gde lábio E	MU	VIN III	bw	+	pêlos	-	-	++16/18(***)
22 ^c	71	VS	VIN III anterior	discromia	clitórís, peq e gde lábio D e E	MU	VIN III	bw	+	pêlos e gls. mucosas	-	-	-
23 ^c	71	R	N	N	clitórís	N	VIN III	bw	++	-	-	-	+ 16/18
24 ^d	49	B	CIN III c/ condiloma	N	N	UN	VIN III	bw	+++	pêlos	-	-	++ 16/18
25 ^d	49	B	N	N	peq e gde lábio D e E, fúrcula, períneo	MU	VIN III	bw	+++	pêlos	-	++	++ 16/18 +31/35/51
26 ^e	78	B	N	N	N	UN	VIN III	S	++	N	-	-	-
27 ^e	82	VS	N	discromia	gde e peq lábio D, gde lábio E	MU	VIN III	bw	+++	N	líquen escleroso	-	-
28 ^f	60	B	N	N	peq lábio E	UN	VIN III	bw	+++	N	-	-	-
29 ^f	60	R	Carcinoma colo Ecib + VAIN III com condiloma	N	peq lábio D e E	MU	VIN III	bw	+	N	-	-	-
30	40	B	N	área Collins (+)	gde lábio D e E	MU	VIN III	bw	++	pêlos	-	+	-

RELAÇÃO GLOBAL DOS DADOS ENCONTRADOS (continuação)

Nº DO CASO	IDADE	MATE-RIAL	DOENÇA TRAT.GEN FEM. BAIXO ASSOC.	ASPECTOS CLIN. OU MACROSC. DAS LESÕES	LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES	FOCALIDADE DAS LESÕES	DIAG. HISTOL. E PROF. DE INVASÃO	VARIANTE HISTOLÓGICA	AK ASSOCIA-DA	EXTENSÃO PARA ANEXOS	ALT. EPITELIAIS ADJACENTES	IMPX	HIS E TIPO DO HPV PRESENTE
31	26	R	N	pápula discrômica	peq lábio D	UN	VIN III	bw	+	-	-	+	-
32	18	B	Condiloma colo	N	N	UN	VIN III	bw	+++	N	-	-	+++16/18 +++31/35/51
33	42	B	N	vegetante	períneo	UN extenso	Ca la 0,13mm	bw	++	N	-	-	+ 16/18
34	70	B	Carcinoma colo EcIII	N	peq lábio	UN	VIN III	bw	++	N	-	-	++ 16/18
35	88	B	N	vegetante ulcerada	N	UN	Ca la 0,10mm	bw	+	N	-	-	-
36	35	B	N	hipercromia	gde lábio	UN	VIN III	bw	-	-	-	+	-

a, b, c, d, e, f - exames correspondentes a uma mesma paciente

Material: VS - vulvectomia simples; B - biópsia; VR - vulvectomia radical; VP - vulvectomia parcial;

R - ressecção da lesão

N - não relatado, impossível avaliar

Ec - estágio clínico

COIII - citologia oncológica, classificação de Papanicolaou Classe III

AK - atipias colicitóticas

VIN II e VIN III - neoplasia intraepitelial vulvar grau II e III, respectivamente

CIN III - neoplasia intraepitelial cervical grau III

VAIN III - neoplasia intraepitelial vaginal grau III

Focalidade: UN: unifocal; MU - multifocal

CA la - carcinoma escamoso da vulva estágio la

Variante histológica: bw: bowenóide; S: simples

+: lesões positivas: + = grau leve, ++ = moderado, +++ = intenso

* avaliação para as sondas tipos 6/11 e 31/35/51 impossível por artefatos técnicos

** positividade para 6/11: + na área de VIN III e +++ em área de condiloma, e para 16/18 + na área de c

+++ em área de VIN III

*** Sonda para os tipos 31/35/51 não foi possível avaliar por artefatos técnicos