

# Papilomavírus na área metropolitana de São Paulo: aspectos citológicos e imunocitoquímicos

LAI WUN SONG SHIH, LUZIA SETUKO UMEDA YAMAMOTO, MARINA YOSHIE SAKAMOTO MAEDA, VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES

**Unitermos:** Papilomavirus. Útero — Doenças. Citologia técnica. Imunocitoquímica.

**Key words:** Papillomaviruses. Cervix diseases. Cytological techniques. Immunocytochemistry.

**RESUMO** — Levantamento de 30.000 laudos citológicos consecutivos de secreções cervicovaginais selecionou 26 casos sugestivos de papilomavírus (HPV) (0,09%). Correlacionamos aqui alterações citológicas em 25 destes casos com a expressão de Ag à imunoperoxidase, utilizando anticorpo anti-BPV-1, cedido pelo Dr. A.B. Jenson. As pacientes apresentavam idade média de 25 anos (19-67 anos), primeira atividade sexual variando de 14 a 25 anos, número médio de gestações 3,4. Apenas 16 casos apresentavam leucorréia. Citologia inflamatória foi encontrada em 13 casos, neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) em 12 (11 NIC I, 1 NIC II); coilocitose foi significativa em 23 (88%), sendo proeminente em seis. Ag HPV foi detectado em 11 (44%). Apenas 2/13 (15,38%) dos casos de citologia inflamatória mostraram positividade à imunocitoquímica, contrastando com nove entre 11 casos de NIC I (81,82%). O caso NIC II não expressava Ag HPV. A freqüência de HPV nessas pacientes da Grande São Paulo foi de 0,09%, sendo de 44% a positividade imuno-histoquímica de Ag HPV, mais elevada nos casos NIC que nos inflamatórios. Negatividade em 14 casos poderia resultar de outros agentes causando coilocitose, baixa sensibilidade deste anticorpo, aos subtipos prevalentes em nossa cidade ou mais provavelmente à flutuação de expressão antigênica em diferentes estágios da infecção.

## INTRODUÇÃO

Lesões condilomatosas, apesar de facilmente diagnosticáveis na região vulvar, freqüentemente passam despercebidas ao exame clínico na vagina e colo uterino. Por esse motivo, análise citológica dos esfregaços colpocervicais tem significativa importância no estudo dessa infecção pelos papilomavírus (HPV).

Papanicolaou, em seu *Atlas de Citologia Esfoliativa*, descreveu que as células obtidas de condiloma acuminado apresentavam aumento nuclear pronunciado, observando-se, por vezes, hiper cromasia nuclear marcante<sup>(18)</sup>. Todas, entretanto, mostravam-se de padrão escamoso superficial ou intermediário, com citoplasma abundante.

Papanicolaou já advertiu que estas células podiam ser confundidas com lesões malignas intra-epiteliais e relatou a presença de halos perinucleares em algumas células, não lhes atribuindo importância diagnóstica.

Várias descrições se seguiram até que Meisels e Fortin, em 1976<sup>(16)</sup>, definiram dois padrões característicos de lesão: a) disqueratose em células isoladas ou formando pequenos grupos com núcleos pequenos e densos; b) *células balonizadas*: células intermediárias aumentadas com um ou mais núcleos, sendo muito freqüentemente a binucleação. Sua cromatina mostra-se levemente irregular e densa. É proeminente um halo perinuclear de limites periféricos nítidos com o restante do citoplasma que se mostra hialino. Esta alteração tornou-se a grande *marca citológica* desta infecção viral, tendo o uso consagrado a denominação *atípicas coilocitóticas*, conforme prévia denominação de Koss<sup>(12)</sup>. Mesmo sendo esses os critérios básicos para o diagnóstico citológico de infecção pelos HPV,

Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia — Setor de Citologia Oncótica, São Paulo, e apresentado no VI World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy, São Paulo, Brasil. Aprovado para publicação em 3/5/88.

com o trabalho de Meisels e Fortin citado pela virtual totalidade de autores, recentes estudos têm definido subdivisões desses padrões analisando separadamente as alterações nucleares, como o grau de atipias, bi ou polinucleação, e as citoplasmáticas, como o limite entre a área central *clara* e a periferia, a presença de disqueratose ou paraqueratose, de grânulos de querato-hialina ou de condensação de filamentos<sup>(1,6,10,15,21)</sup>.

Esta infecção de caráter sexualmente transmissível apresenta prevalência variável de 0,05 até 2% das mulheres estudadas à citologia<sup>(3,16,19,21)</sup> ou, ainda mais, com índices próximos de 10% em mulheres de 15 a 50 anos por hibridização molecular com sondas radioativas<sup>(7)</sup>. Sabe-se hoje que, dos mais de 40 tipos de papilomavírus já descritos, diversos deles (especialmente os tipos 16, 18, 31, 33 e 35) já foram identificados em carcinomas invasivos de colo uterino<sup>(6,7)</sup>. Esta neoplasia, infelizmente, é a de maior prevalência nas mulheres brasileiras, o que confere a essa infecção viral maior importância em nosso meio<sup>(4)</sup>.

Os objetivos do presente estudo são: 1) avaliar a frequência do padrão citológico sugestivo de HPV em população da região metropolitana de São Paulo; 2) confirmar a aplicabilidade, em nosso país, da pesquisa de antígeno de papilomavírus pelo método da peroxidase-antiperoxidase em amostras previamente coradas pelo método de Papanicolaou; 3) analisar a distribuição da expressão antigênica em diferentes estágios de infecção.

## MATERIAL E MÉTODOS

Análise retrospectiva de 30.000 amostras citológicas de secreção cervicovaginal consecutivas de pacientes de baixa renda, estudadas de 1984 a 1986, no Setor de Citologia Oncótica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (laboratório de Saúde Pública do Estado de São Paulo), permitiu identificação de 26 casos sugestivos de infecção por HPV. Essa pesquisa teve por base as clássicas definições de Meisels e Fortin<sup>(16)</sup>, bem como as subdivisões mais recentemente descritas<sup>(1,6,10,15,21)</sup>.

Dados suficientes foram obtidos de 25 dessas pacientes que foram reavaliadas quanto à faixa etária, idade à primeira atividade sexual, número de gestações e queixas ginecológicas. A avaliação citológica visou o diagnóstico apresentado segundo classificação atual proposta pela Organização Mundial de Saúde em 1984<sup>(17)</sup>, pesquisando-se ainda a flora microbiana associada. Sendo a colócitose um dos critérios citológicos de maior importância<sup>(6,21)</sup>,

resolvemos comparar sua distribuição com a expressão do antígeno HPV pelo método imunocitoquímico da peroxidase-antiperoxidase<sup>(22)</sup>. Cada um desses parâmetros foi semiquantificado em quatro graus: 0) ausente; 1) discreto; 2) moderado; 3) acentuado. O anticorpo antipapilomavírus nos foi cedido gentilmente pelo Professor Alfred Bennett Jenson (Georgetown University, EUA). Foi obtido a partir de antígeno de papilomavírus bovino tipo I, previamente tratado com mercaptoetanol e SDS (*sodium dodecyl sulfate*), de maneira a expor antígenos provavelmente comuns a todos os papilomavírus humanos e animais atualmente conhecidos<sup>(11,13)</sup>. O anticorpo de ligação (porco antioelho) e o complexo peroxidase-antiperoxidase são de origem comercial (*Dako Co.*, EUA).

Lâminas dos 25 casos com citologia sugestiva para HPV foram demarcadas com lápis diariamente para facilitar a localização das células suspeitas. Para a aplicação da técnica imunocitoquímica, os esfregaços foram descorados em álcool-ácido, posteriormente lavados com tampão salina fosfato (PBS) por cinco minutos. Depois do bloqueio da atividade de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (3%) em metanol, procedeu-se a incubação por 20 minutos com soro normal de porco a 37°C para reduzir a inespecificidade. A seguir, os esfregaços foram incubados com IgG de coelho antipapilomavírus (diluído 1:120) por 60 minutos a 37°C. O anticorpo de ligação IgG de porco anti-IgG de coelho (diluído 1:30) foi incubado por 30 minutos a 37°C. A reação com o complexo peroxidase-antiperoxidase produzido em coelho (diluído 1:40) teve 30 minutos de duração a 37°C. A revelação da reação se fez pela solução substrato contendo 30mg de 3,3 diamino-benzidina e 1,2ml de peróxido de hidrogênio 3% em 100ml de tampão PBS, durante três minutos à temperatura ambiente. As amostras foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas, diafanizadas e montadas com bálsamo do Canadá. Entre cada uma das etapas, foram efetuadas três lavagens com PBS pH 7,4, cada qual com três minutos de duração.

Como controles de especificidade e sensibilidade da reação, as seguintes lâminas foram, simultaneamente aos casos-teste, submetidas à mesma seqüência de reações: 1) amostra tecidual obtida por biópsia de um caso de condiloma acuminado sabidamente positivo para Ag HPV (controle positivo); 2) amostra citológica vaginal de um caso sabidamente normal (controle negativo). Ainda para garantir inexistência de inespecificidade, foi também efetuada a seqüência de reações, excetuando-se a incubação

com anticorpo primário, em material tecidual contendo Ag HPV.

## RESULTADOS

As pacientes apresentavam idades variando de 19 a 67 anos, com média de 28,7. A idade à primeira atividade sexual variou de 14 a 25 anos, com média de 18,7 anos. O número médio de gestações foi de 3,4, notando-se desde nulíparas até pacientes com 13 gestações.

A tabela 1 apresenta o diagnóstico citológico dos 25 casos sugestivos de infecção por HPV em comparação com os 30.000 esfregaços obtidos da população geral.

TABELA 1

Comparação dos diagnósticos citológicos de 25 casos sugestivos de HPV pelo método de Papanicolaou e dos 30.000 esfregaços da população geral

Diagnóstico	Casos com papilomavírus		População geral	
	Nº	%	Nº	%
Material inadequado			969	3,23
Normal			9.067	30,22
Inflamatório	13	52,00	19.358	64,52
NIC I	11	44,00	172	0,57
NIC II	1	4,00	48	0,16
NIC III			38	0,14
Carcinoma invasivo			20	0,07
Outros			328	1,09
Total	25	100,00	30.000	100,00

TABELA 2

Diagnóstico citológico x expressão antigênica do HPV

HPV	Diagnóstico		
	Inflamatório	NIC I	NIC II
positivo	2	9	0
negativo	11	2	1

TABELA 3

Grau de coilocitose x expressão antigênica do HPV (análise semiquantitativa)

HPV Ag	Coilocitose	
	0-1	2-3
0-1	11	96
2-3	3	04

0-1 ausente/discreto

2-3 moderado/intenso

Com relação à flora microbiana, observaram-se 11 casos com flora bacteriana bacilar, sendo bactérias cocóides encontradas em 12 e flora bacteriana mista em dois casos. Associado à flora cocóide encontramos dois casos de *Trichomonas vaginalis* e um caso de *Candida sp* associado à flora bacilar.

Na tabela 2 verificamos apenas 2/13 casos de citologia inflamatória mostrando positividade à imunocitoquímica, contrastando com nove dentre 11 casos de NIC I. O caso de NIC II não expressava Ag HPV.

Na tabela 3, coilocitose esteve presente em 23 casos (88%), seis dos quais em numerosas células (+ + +) (fig. 1). Em cinco casos a coilocitose apresentou-se em grau moderado, estando presente em grau mínimo (+) nos ou-



Fig. 1 — Célula epitelial escamosa com coilocitose: o núcleo é aumentado e apresenta hiper Cromasia. Note-se halo citoplasmático de limites externos bem definidos (caso 4, col. Papanicolaou, x400).

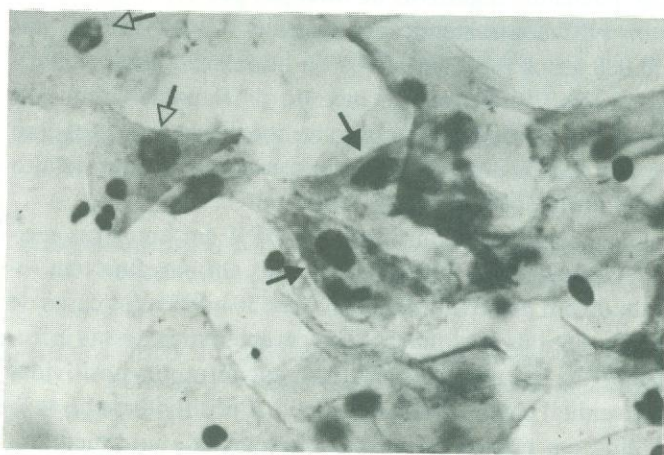


Fig. 2 — Duas células epiteliais (→) têm núcleos enegrecidos devido à positividade para antígeno de papilomavírus ao método da peroxidase antiperoxidase. Outras células, com núcleos negativos, são apresentadas para comparação (→). (Caso 5, Ag HPV, PAP, x200).

tros 12 casos. Os dois casos restantes, ainda que sem coilocitose conspícua, preenchem os critérios de Schneider e cols. <sup>(21)</sup> para diagnóstico citológico de infecção por HPV. Antígeno de HPV foi detectado em 11 amostras (44%). Esta expressão foi acentuada (+ + +) em quatro esfregaços, mostrando-se moderada (+ +) em três casos. Os outros quatro apresentaram esparsas células positivas para Ag HPV (+). Tal expressão está apresentada na figura 2.

## DISCUSSÃO

Ainda que não corresponda ao método de mais alta sensibilidade para a análise de infecção pelos papilomavírus, o exame citológico tem grande utilidade na identificação dessas infecções <sup>(3,4,12,16,20,23)</sup>. Recentemente, os próprios Schneider e cols. <sup>(21)</sup>, do Departamento de Pesquisas Virais do Centro de Pesquisas de Câncer de Heidelberg, pioneiro na produção de sondas de DNA para o estudo de HPV por hibridização molecular, afirmaram que "este método não será introduzido na rotina diagnóstica em futuro próximo e que a pré-seleção das pacientes de alto risco merecedoras de investigação mais sofisticada continuará tendo por base os critérios citológicos".

No presente estudo, a positividade em 26 casos corresponde a 0,09 da população estudada. Dentre os dados clínicos, merece destaque o fato desta infecção acometer mulheres jovens, com início precoce de atividade sexual, e a ausência de leucorréia em mais de 1/3 das pacientes.

Nosso estudo revela, também na Grande São Paulo, forte associação entre citologia sugestiva para HPV e o achado de neoplasia intra-epitelial cervical, já que 48% das pacientes sugestivas de infecção por HPV apresentaram NIC contrastando com apenas 0,94% de NIC nos 30.000 casos representativos da população geral. Zeferino e cols. <sup>(24)</sup>, através do método de Papanicolaou, colposcopia e biópsia, relataram também que pacientes com lesões condilomatosas deveriam ser consideradas de alto risco para a ocorrência de NIC.

A pesquisa de antígeno de HPV em amostras teciduais fixadas em formol e incluídas em parafina tem resultado em positividade variável de 30 a 67% dos casos de lesões genitais com morfologia característica dessas infecções <sup>(1,2,6)</sup>. Em nosso laboratório, encontramos positividade tecidual em 63,7% dos casos <sup>(1)</sup>. A positividade de 44% obtida em nossos esfregaços citológicos é intermediária entre os 30% relatados por Deligeorge Politi e cols. <sup>(6)</sup> e os 62% encontrados por Gupta e cols. <sup>(9)</sup>. Esses achados permitem concluir que a pesquisa de HPV pelo método de

peroxidase-antiperoxidase é possível mesmo em lâminas contendo esfregaços citológicos previamente corados pelo método de Papanicolaou e que os métodos de colheita, fixação e coloração usados na rede pública da Grande São Paulo e os procedimentos imunocitoquímicos aplicados em nosso laboratório estão dentro dos padrões internacionais de qualidade. Visto que as metodologias citológicas e imunocitoquímicas provaram ser adequadas, torna-se importante uma análise crítica para o fato de apenas 44% dos casos apresentarem o Ag HPV. Uma primeira explicação poderia ser a de que outros agentes causassem coilocitose <sup>(14)</sup>. Na verdade, nem todos os coilocitos têm partículas virais <sup>(5)</sup>. Entretanto, é consenso na bibliografia <sup>(5-7,9,16)</sup> que, quando presente, a coilocitose é marcador altamente característico da infecção por HPV. Quanto à sensibilidade do anticorpo ou do método de amplificação (PAP), sabe-se que o anticorpo desenvolvido pela equipe da Georgetown University, aqui utilizado, é um dos anticorpos-padrões dos laboratórios de todo o mundo <sup>(6,9,13)</sup>. Já o método de PAP é considerado de altíssima sensibilidade, sendo aproximadamente 1.000 vezes superior à imunofluorescência <sup>(22)</sup> e até mais sensível que a microscopia eletrônica <sup>(8)</sup>. Assim sendo, resta a hipótese de variação da expressão antigênica nas diversas etapas da infecção. Esta hipótese, já levantada por Kurman <sup>(1)</sup> em amostras teciduais de biópsia, também é valorizada por De Villiers <sup>(7)</sup>. De fato, em nossa casuística, a expressão nos casos de NIC foi 9/11, em franco contraste com outra fase de infecção, com padrão apenas inflamatório, em que o Ag foi detectado apenas em 2/13 casos.

Através do estudo semiquantitativo observou-se paralelismo entre o grau de coilocitose e de expressão do Ag HPV. Essa correlação foi especialmente significativa nos casos de neoplasia intra-epitelial cervical: apenas dois (25%) dentre oito casos com coilocitose mínima ou ausente apresentavam significativa expressão do Ag HPV contrastando com expressão exuberante do Ag em todos os quatro casos em que a coilocitose era acentuada. Esses dados corroboram prévias sugestões de que a coilocitose poderia corresponder ao efeito citopático do HPV <sup>(9)</sup>.

## CONCLUSÕES

A frequência de alterações citológicas sugestivas de infecção por HPV em nossa população é de 0,09%.

A detecção de antígeno de HPV pelo PAP tem importância diagnóstica em saúde pública, mostrando-se aplicável em lâminas previamente coradas pelo método

de Papanicolaou, detectando, na presente casuística, 44% de positividade nos casos citologicamente sugestivos.

A expressão antigênica do HPV varia em diferentes estágios da infecção. Nesta casuística, a expressão foi muito superior nas NIC I que nos casos que apresentaram apenas padrão inflamatório.

Estudos semiquantitativos revelam que a expressão antigênica do HPV é paralela ao grau de coilocitose, corroborando a prévia sugestão de que a coilocitose poderia corresponder ao efeito citopático do HPV.

#### SUMMARY

*A retrospective analysis of 30,000 consecutive reports of cervicovaginal Papanicolaou smears from this public health laboratory (Instituto Adolfo Lutz) allowed the screening of 26 cases suggestive of HPV (0.09%). The authors studied 25 of these cases looking for cytologic patterns in Papanicolaou stained smears and also for intracellular HPV Ag applying the peroxidase-antiperoxidase method. Primary polyclonal antibody anti-BPV-1, claimed to stain most subtypes of HPV was gently*

*supplied by Dr. A.B. Jenson. Mean age of patients was 25 ys (19-67 ys); first sexual activity varied from 14 to 25 ys and the mean number of pregnancies was 3.4. Only 16 patients presented overt vaginal discharge. Inflammatory cytology was found in 13 cases, whereas intraepithelial neoplasia (CIN) was diagnosed in 12 (11 CIN I; 1 CIN II); koilocytosis was significant in 23 cases (88%) and it was prominent in 6. HPV Ag was detected in 11 cases (44%). It is remarkable that only 2 of 13 (15.38%) "inflammatory cases" disclosed HPV Ag, contrasting with positive findings in 9 of 11 (81.82%) of CIN I cases. HPV Ag was not found in the CIN II case. In conclusion, the findings revealed a frequency of 0.09% of HPV in São Paulo Metropolitan Area females and 44% of these cases expressed HPV Ag through imunoperoxidase technique. Positivity was higher in CIN I cases than in inflammatory ones. Negative results in 14 cases might be related to the possibility of other agents causing cytologic alterations mimicking HPV, to a low sensitivity of this antibody to HPV subtypes prevalent in our city or, most probably, to the periodicity of antigenic expression in different stages of the infection.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, VAF et al Condiloma do colo uterino: correlação de dados colposcópicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos. (In press).
- ANDRADE, L et al Morphological and immunocytochemical evaluation of human papillomavirus lesions in cervical biopsies. In: World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy. São Paulo, 1987 (Abstracts).
- AYALA, MJ et al Citologia ginecológica. 2ª ed., São Paulo, Científica, 1985.
- BRUMINI, R et al Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-1980. Ministério da Saúde, 1982.
- CASAS-CORDERO, M et al Origin of the koilocyte in condylomata of human cervix ultrastructural study. Acta Cytol. 25: 383-392, 1981.
- DELIGEORGI-POLITI, H et al Immunocytochemical localization of human papillomavirus and cytomorphologic correlation in smears and biopsies of cervical flat condylomata. Diag. Cytopathol. 2: 320-325, 1986.
- DE VILLIERS, EM et al Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. Lancet, II: 703-705, 1987.
- FERENCZY, A; BRAUN, L; SHAH, KV Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of the cervix: a comparative ultrastructural and immunohistochemical study. Am. J. Surg. Pathol. 5: 661-669, 1981.
- GRUPTA, JW et al Distribution of human papillomavirus antigen in cervicovaginal smears and cervical tissues. Int. J. Gynecol. Pathol. 2: 160-170, 1983.
- GUPTA, JW et al Detection of human papillomavirus in cervical smears: a comparison of in situ hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. Acta Cytol. 31: 387-396, 1983.
- JENSON, AB et al Immunological relatedness of papillomaviruses from different species. J. Natl. Cancer Inst. 64: 495, 1980.
- KOSS, LG & DURFEE, GR Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. Ann. N.Y. Sci. 63: 1.235-1.261, 1956.
- KURMAN, RJ et al Detection of human papillomavirus by immunocytochemistry. In De LELLIS: Advances in immunohistochemistry. New York, Masson, 1984. p. 201-221.
- LIRA NETO, JB Aspectos citológicos da infecção ginecológica pelo papiloma vírus humano. J. Bras. Ginecol. 95: 281-287, 1985.
- McLEO, DK Prediction of human papillomavirus antigen in cervical squamous epithelium by koilocyte nuclear morphology and "wart scores": confirmation by immunoperoxidase. J. Clin. Pathol. 40: 323-328, 1987.

16. MEISELS, A & FORTIN, R Condylomatous lesions of the cervix and vagina: 1) cytologic patterns. *Acta Cytol.* 20: 505-509, 1976.
17. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD Manual de normas y procedimientos para el control de cancer de cuello uterino. Washington, 1984.
18. PAPANICOLAOU, G Atlas of exfoliative cytology, Cambridge Massachusetts, Harvard University Press, 1960. p. 18-19 (suppl 2).
19. REID, R et al What is the prevalence of sexually transmitted papillomaviral infection? In World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy, São Paulo, 1987. (Abstracts).
20. RICHART, RM Histological aspects of cervical viruses. In World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy. São Paulo, 1987. (Abstracts).
21. SCHNEIDER, A et al Sensitivity of cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diag. Cytopathol.* 3: 250-255, 1987.
22. STERNBERGER, LA et al The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradisch peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315, 1970.
23. STERNBERGER, LA Immunocytochemistry, 3<sup>o</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, 1986.
24. ZEFERINO, LC; OYAKAWA, N; PINOTTI, JA Association of the condylomatous lesions and cervical neoplasia. In World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy. São Paulo, 1987. (Abstracts).

## XXX Reunião Anual de Cancerologia XIV Encontro dos Ex-Residentes do Instituto Central III Jornada de Enfermagem em Oncologia

13 a 15 de outubro de 1988

Local: Hospital A.C. Camargo — Fundação Antônio Prudente  
Anfiteatro Senador José Ermírio de Moraes  
Rua Prof. Antônio Prudente, 211, São Paulo, SP — CEP 01509

Informações: Tel. (011) 278-8811, ramal 134

Convidados estrangeiros: Jeffrey Eckardt (EUA) — Tumores ósseos  
Arlan Fuller (EUA) — Tumores ginecológicos  
Reinaldo D. Chacon (Argentina) — Tumores de mama

Inscrição: médicos — 6 OTN's  
estudantes e residentes — 4 OTN's  
enfermeiras — 2 OTN's