

HERPES VIRUS SIMPLES E CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO

"Ganhador do Prêmio Oswaldo Cruz, Áreas
clínico/cirúrgica"



Jorge Saad Souen *
Walter Pinheiro **
Sun Rei Chen ***
Terezinha Yamada ***
Carlos Alberto Salvatore ****

RESUMO

Nos últimos anos tem-se imputado relevante papel ao herpes vírus simples (HSV), como agente etiológico do carcinoma cérvico-uterino. Tal premissa baseia-se em dados epidemiológicos, similares em ambas as condições: a infecciosa e a neoplásica. Sabendo-se da possibilidade, comprovada experimentalmente e, às vezes clinicamente, de vírus constituírem-se em agentes neoplásicos, aventouse a hipótese acima referida. No intuito de colaborar no esclarecimento de tão importante questão, procuramos, em nosso meio, pesquisar essa possibilidade. Efetuamos estudos clínico-anamnéticos, citológico, virológicos e sorológicos em portadoras de câncer comparando-as a mulheres de grupo controle. As três primeiras pesquisas objetivaram surpreender a presença momentânea do vírus; e a última permitiu intuir uma possível infecção progressiva, que possivelmente possa ter induzido à oncogênese. A análise sucinta clínico-anamnética pesquisou sintomas e sinais de infecção presente e passada na mulher e no parceiro. O estudo citológico, demonstrando características celulares típicas de doença herpética, autorizou-nos, com certa precisão, detectar a presença do vírus. Igualmente o estudo virológico, através de efeitos indiretos citopáticos em culturas de células, acarretados pelo herpes, denunciou a presença de tal micro-organismo. O estudo sorológico procurou detectar no sangue periférico, anticorpos anti-SHV, por meio de uma reação de fixação de complemento. Os nossos estudos não demonstraram que as cancerosas eram mais asiduamente suspeitas de infecção herpética atual ou passada. Concluímos que o HSV não deve ser o único agente etiológico da infecção neoplásica, podendo ocorrer uma somatória de fatores, entre os quais talvez a virose possa representar um dos elementos.

INTRODUÇÃO

A gênese virótica nas neoplasias vem sendo considerada há alguns anos. Em animais, o papel causal dos vírus como agentes de neoplasias tem sido aventado desde 1911, quando Rous estudou a indução de sarcomas em galinhas por meio de "substância filtrável". Tal substância foi mais tarde reconhecida como provável vírus e, mais recentemente, comprovada pela demonstração do vírus no interior das células, empregando-se microscopia eletrônica. A infecção a vírus foi, igualmente, relaciona-

da ao linfoma de Marek, ao adenocarcinoma de Lucké em rãs, e às leucemias de primatas e de coelhos.

Na espécie humana, o vírus de Epstein-Barr vem sendo responsabilizado pelo linfoma de Burkitt. Há tempos, Epstein e cols.⁹, além de Rabson e cols.²⁰, observaram partículas viróticas em tal neoplasia. Igualmente, em gânglios linfáticos de leucêmicos, Dmochowsky e Grey⁷, em 1957, demonstraram partículas similares às de vírus e Beard³ e Braunsteiner e cols.⁴ as detectaram na medula óssea.

Em ginecologia o interesse foi despertado devido ao possível papel do herpesvírus simples tipo 2 (HSV-2) na etiologia do carcinoma cérvico-uterino. Há uma identidade epidemiológica entre a virose mencionada e o câncer do colo, ambas apresentando características de infestação que sugerem transmissão venérea. Assim é que Rotkin²⁵, Lundin Jr.¹⁵ e Fidler¹⁰, entre outros, consideram a neoplasia maligna epidermóide do colo uterino como transmissível através do ato sexual. Da mesma forma Centifanto e cols.⁶, Epstein⁹ e Hutfield e cols.¹³ afirmam ser a infecção genital pelo HSV-2 de natureza venérea. De fato, segundo Nahmias e cols.¹⁶, a maioria das mulheres que têm relação sexual com herpéticos adquire a infecção e desenvolve anticorpos anti-herpes. Por outro lado, é infrequente o achado de anticorpos anti-herpes em religiosas e frequentíssimas em mulheres promiscuas, com más condições de higiene (Rawls e Kaufman²³, e nível sócio-econômico baixo (Centifanto e cols.⁶, similarmente ao que ocorre em relação à incidência do carcinoma cervical. A partir dessas constatações procurou-se tendo em vista os dados anteriormente citados da possibilidade de oncogênese dos vírus, atribuir ao HSV-2 a etiologia do câncer do colo do útero (Pereyra, 1961¹⁹, Barron e cols., 1971², e Terris e cols.²⁸, 1967).

Ultimamente numerosos estudos vêm se desenvolvendo no sentido de esclarecer o verdadeiro papel da etiologia virótica no carcinoma cérvico-uterino. No Brasil, onde tal tipo de câncer é ainda o que mais acarreta óbito entre mulheres, não se desenvolveu um estudo profundo a respeito, o que seria de grande interesse. Com esse objetivo realizamos o nosso estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

a. Pacientes utilizadas para o estudo

Foram estudados 2 grupos de pacientes matriculadas na Clínica Ginecológica da FMUSP, compreendendo o período de fevereiro de 1975 a fevereiro de 1981. O grupo I foi constituído de 30 mulheres não portadoras de câncer cérvico-uterino. Todas apresentavam colpocitologia oncótica negativa (Classe I ou II de Papanicolaou)

Professor-Docente — Clínica Ginecológica da FMUSP

** Assistente — Clínica Ginecológica da FMUSP

*** Acadêmicos — FMUSP (5.º e 6.º ano).

**** Professor Titular — Clínica Ginecológica da FMUSP.

e colposcopia com aspectos não suspeitos. O grupo II foi formado por 30 pacientes portadoras de carcinoma do colo do útero comprovado histologicamente. Estas 30 pacientes do grupo II apresentavam-se com os seguintes resultados colposcópicos: Classe III = 5 pacientes; Classe IV = 12 pacientes e Classe V = 13 pacientes. Os resultados colposcópicos de acordo com a nomenclatura internacional, aprovada no Congresso Mundial de Patologia Cervical e Colposcopia em Graz, Áustria, em 1975 foram: transformação atípica = 7 casos; suspeita de invasão = 21 casos; colo não visualizado (insatisfatório) = 2 casos. Os estadiamentos, nestes 30 casos, estavam assim distribuídos:

Est. O (Ca "in situ") = 7 vezes; Est. Ia = 1 vez; Est. Ib = 6 vezes; Est. Iib = 6 vezes; Est. IIIb = 10 vezes. O diagnóstico anátomo-patológico revelou carcinoma escamoso em 29 casos e adenocarcinoma em 1 caso.

b. Estudo clínico

Em todas as clientes foram investigados antecedentes sintomáticos sugestivos de infecção herpética, quer na mulher, quer no parceiro. Para tanto as pacientes foram sucintamente interrogadas. Igualmente, o exame ginecológico foi minuciosamente conduzido no sentido de se verificar a presença de sinais compatíveis com herpes genital.

c. Estudo virulógico

Foi tentado o isolamento do vírus através de método inicialmente testado em 2 casos com comprovado herpes simples genital. Empregou-se a seguinte metodologia:

1 — A colheita do material consistiu em raspagem da cérvix com espátula de Ayre e mistura a 1 ou 2 ml de meio 199 com soro de vitelo a 1% a 4°C por uma a três horas, sendo, em seguida, estocado a -60°C.

2 — Tratamento do material com: Penicilina = 20.000 UI/ml; Estreptomina = 500 mg/ml; Ampicilina = 50 mg/ml e Fungizone = 2,5 mg/ml. Posterior controle bacteriológico em Agar-sangue por 48-72 h. a 36-37°C. Após comprovar-se ausência de crescimento de germes, procedeu-se à inoculação em culturas celulares.

3 — O sistema celular empregado foi a linhagem contínua de células SIRC (córnea de coelho) mantidas em meio de Eagle com soro de vitelo a 2%. O volume do material inoculado nos tubos de culturas celulares variou de 0,2 a 0,4 ml, inoculando-se 4 a 6 tubos por material.

4 — Após 48h. da inoculação, procedeu-se a leituras diárias durante 7 dias, sob microscopia óptica, para observação do efeito citopático característico.

5 — Os tubos que apresentam ou não efeito citopático característico foram mantidos a -60°C, até se realizarem as passagens seriadas. De cada material praticou-se duas passagens, com intervalo de 7 dias. As culturas que não demonstraram efeito citopático foram rotuladas como negativas.

6 — Os tubos que apresentaram efeito citopático característico foram congelados novamente a -60°C para posterior identificação com soro imune específico conhecido.

d. Estudo citológico

1 — A colheita constituiu em raspado cervical com espátula de Ayre e esfregaço em lâminas, com imediata fixação em álcool-éter.

2 — Coloração através do método de Papanicolaou observando-se as seguintes minúcias: células gigantes,

multinucleação (na qual os núcleos não se superpõem, permanecendo lado a lado); vacuolização nuclear e citoplasmática; corpúsculos de inclusão intranucleares, condensação cromatínica junto à membrana nuclear e aspecto em espelho dos núcleos.

e. Estudo sorológico

Estudamos a presença de anticorpos anti-vírus (HSV) através de coleta do sangue periférico nas mulheres dos dois grupos. Desenvolvemos uma microtécnica de fixação de complemento contra antígenos do HSV (50% de hemólise).

RESULTADOS

1 — Estudo clínico

Os resultados referentes ao passado herpético e exame ginecológico estão expostos nas Tabelas 1 e 2, com a respectiva análise estatística.

Tabela 1 — Pesquisa de antecedentes herpéticos

Antecedente sugestivo de infecção herpética	Grupo controle 30 pacientes	Grupo Câncer 30 pacientes
Paciente	4 13,33%	2 6,67%
Parceiro	0	0
$p = 0,2119 (> 0,05)$		

Tabela 2 — Exame Ginecológico — Presença de sinais clínicos de infecção herpética genital

Exame ginecológico	Grupo Controle (30)	Grupo Câncer (30)
Suspeito de infecção virótica	0	0

2 — Isolamento do vírus

Não foi isolado vírus em células SIRC dos materiais obtidos no grupo câncer ou no grupo controle.

3 — Estudo citológico

A Tabela 3 demonstra nossos resultados e respectiva apreciação estatística, em 25 casos do grupo controle e 22 do grupo câncer, nos quais foi possível realizar o estudo.

Tabela 3 — Alterações citológicas encontradas

Alterações citológicas sugestivas de infecção herpética	Presentes	Ausentes	Total
Grupo Controle	0 (0%)	25	25
Grupo Câncer	2 (8,33%)	22	24
$p = 0,2551 (> 0,05)$			

4 — Estudo sorológico

Os nossos resultados quanto a tal pesquisa demonstraram títulos que variaram de 0 a 1/512, quer entre as mulheres de grupo controle, como do grupo câncer.

Usando-se a transformação logarítmica e aplicando-se o teste de duas médias (considerados os desvios padrões iguais), através da distribuição *t* de Student, não detectamos diferença significativa ($p > 0,05$).

COMENTÁRIOS

Numerosos autores têm demonstrado que mulheres portadoras de câncer invasivo do colo do útero apresentam anticorpos anti HSV-2 em percentual mais elevado. Rawls e cols.²¹, em Houston, encontraram, através da técnica de neutralização, 83% de mulheres com anticorpos anti HSV-2 em grupo de portadores de câncer invasivo, contra 22% no grupo controle. Resultados similares foram achados por Nahmias e cols.¹⁶ em Atlanta, usando a microtécnica de neutralização; por Sprecher-Goldeberger e cols.²⁷ em Bruxelas, utilizando a técnica de multiplicidade de análise, e por Adelusí e cols.¹, na Nigéria, empregando a técnica de imunofluorescência. Adelusí¹ chamou a atenção para o fato de que os anticorpos se achavam elevados apenas em casos de carcinoma escamoso não em adenocarcinomas ou sarcomas do colo do útero.

Os resultados, no entanto, não são concordantes no que se relaciona às lesões pré-malignas e aos cânceres incipientes da cérvix. Royston e Aurelian²⁶ encontraram displásicas com percentual de 95% de anticorpos anti HSV-2 comparativamente a 50% no grupo controle. No entanto, Rawls²⁴, em amostragem semelhante à estudada em Houston, encontrou 24% e 22% para os grupos de displasia e testemunha, respectivamente.

São díspares também os achados no carcinoma "in situ". A escola de Houston, representada por Rawls, citado anteriormente, não encontrou anticorpos anti HSV-2 significativamente aumentados em relação aos do grupo controle. Nahmias¹⁷ e Royston e Aurelian²⁶ encontraram anticorpos anti HSV-2 em 100% das pacientes com carcinoma "in situ", em comparação a apenas 53% nas não cancerosas.

Como se percebe, os resultados são variáveis, dependendo do local de estudo. Provavelmente, em ambientes mais promíscuos, e regiões de condições sócio-econômicas baixas, pode ocorrer contacto com o vírus em épocas precoces da vida da mulher. Este fenômeno talvez pudesse explicar os nossos achados onde se percebe que a grande maioria de mulheres do grupo controle apresentavam evidência sorológica de afecção passada. Ressalte-se que a técnica por nós utilizada, não permitiu distinguir a afecção pelo HSV-1 daquela pelo HSV-2. Não obstante, de qualquer maneira as variantes se anulam quando comparam-se os grupos e de qualquer sorte não encontramos diferença significativa na comparação entre mulheres com e sem carcinoma.

Igualmente contraditórios são os estudos citológicos. Naib e cols.¹⁸ comprovaram que entre pacientes com evidência citológica de infecção herpética, atual ou passada, 23,7% desenvolveu anaplasia cervical, desde displasias até câncer invasivo. Ao contrário, entre as mulheres que não apresentavam alterações citológicas para vírus, apenas 1,6% desenvolveu qualquer tipo de anaplasia. No entanto, Wolioska e Melamed²⁹ não chegaram às mesmas conclusões. Idênticamente não encontramos, quanto a tal pesquisa, diferença significativa entre as mulheres dos dois grupos estudados.

Os efeitos citopáticos por nós estudados também foram considerados por outros autores, entre os quais Centifanto^{5,6} e Ejército⁸ e os resultados, igualmente, não foram concordantes.

As pesquisas não demonstraram ocorrência de vírus em lesões cancerosas, quer utilizando tentativa de iso-

lamento de vírus pelos métodos habituais, quer empregando o estudo de alterações citológicas. Neste último caso, os achados de tais alterações em duas pacientes, comparados a nenhuma em grupo controle, não foi significativo. Igualmente, apesar de difícil avaliação do ponto de vista subjetivo, não houve maior incidência clínica de afecção herpética atual ou passada.

As pesquisas que procuram achar vírus no momento da presença do câncer não obrigatoriamente determinam a sua ação etiológica. De fato, a indução pode ter sido anterior e no momento que a mulher se apresenta com a doença o vírus pode não estar presente. Os estudos sorológicos, no entanto, denunciariam esta condição; e mesmo este estudo não exibiu diferença quando comparamos mulheres dos 2 grupos.

Segundo Rawls e Kaufman²³, os diversos achados encontrados nas lesões pré-cancerosas e pré-invasivas poderiam ser explicados atentando-se para o fato de que nem todas aquelas lesões evoluem para a forma invasiva, e o HSV-2, se presente, induziria a tal transformação.

Por outro lado, as técnicas sorológicas empregadas pelos diferentes autores foram diversas, o que em parte poderia explicar as discrepâncias encontradas.

A possibilidade oncogênica dos vírus é mais complexa do que possa parecer inicialmente. Eminentemente especialistas reunidos no México, em 1972¹⁴, assim como vários outros estudiosos (Ramos Jr.²¹), salientam que o vírus, uma vez induzida alteração da mensagem genética e deturpada a modulação cito-histo-fisiológica das células normais, pode retirar-se do meio celular; entretanto, mesmo assim, subsistirão as degenerações causadas por sua passagem. O novo código genético estabelecido, que transforma a célula normal em neoplásica, é chamado "genoma neoplásico", sendo o responsável pela alteração na frequência da reprodução celular. Não se deve esperar, portanto, que se encontre o agente virótico em neoplasias, mesmo que se suponha ser ele o agente oncogênico. Por outro lado, mesmo na vigência do agente indutor, há necessidade de susceptibilidade genética da célula. Os protovírus ou oncogenes seriam DNA similares às moléstias dos vírus, e para que a célula recebesse a indução virótica oncogênica, deveria possuí-los. Há dúvidas, inclusive, se os próprios oncogenes não seriam componentes virais incorporados há tempos ao componente genético normal (Huebner e Todaro^{11,12}). Assim sendo, pode-se explicar, igualmente porque muitas portadoras de herpesvírus não apresentariam carcinoma cervical. O câncer, para instalar-se, necessita da presença do gene transmitido e do indutor, além de outros fatores, alguns já conhecidos, como a carga epidemiológica que favorece sua instalação.

SUMMARY

An important role has been ascribed to the herpesvirus simplex (HSV) in the etiology of uterine cervical cancer. We have studied 60 women, 30 of them with cervical uterine cancer and another 30 without them. We performed clinical, cytological, cytopathic and serological studies. The last one permitted to conclude past infections and the others the presence of the virus concomitantly. The clinical study found out the antecedents of the women and their partners concerned signs and symptoms of the disease. In addition we performed a careful gynecological exam in order to detect the viral disease. By the other hand we searched cytological alterations characteristic of the presence of the virus in cervical smears. The cytopathic effects was observed in rabbit cornea culture cells (SIRC-cells). The serological study consisted in a complement fixation microtechnics

against antigen of the herpes virus (50% of hemolysis). We compared statistically the results of the two groups and did not find any significative difference relatively of the various parameters studied.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adelusi, B.; Osunkoya, B. O. & Fabiyi, A. — Antibodies to herpes virus type 2 in carcinoma of the cervix uteri in Ibadan, Nigeria. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **123**: 758, 1975.
2. Barron, B. A. & Richart, R. M. — An epidemiologic study of cancer neoplastic disease. *Cancer* **27**: 978, 1971.
3. Beard, J. W. — Viral tumors in cancer research. In Pollard, M. — Perspectives in virology. New York — John, Wiley Sons, 1959.
4. Braubsteitner, H.; Fellinger, V. & Pakesch, F. — On the occurrence of virus — live bodies in human leucemia. *Ann. Intern. Med.* **62**: 889, 1965.
5. Centifanto, Y. M.; Drylie, D. M.; Deardourff, S. L. & Kaufman, H. E. — Herpesvirus type 2 in the male genitourinary tract. *Science*, **178**: 318, 1972.
6. Centifanto, Y. M.; Hildebrandt, R. J.; Held, B. & Kaufman, H. E. — Relationship of herpes simplex genital infection and carcinoma of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **110**: 690, 1971.
7. Dmochowsky, L. & Grey, C. E. — Election microscopy of tumors of Known and suspected viral etiology. *Tex. Rep. Biol. Med.* **15**: 704, 1957.
8. Ejercito, P. M.; Kieff, E. D. & Roizman, B. — Characterization of herpes simplex virus strains. *J. Gen. Virol.* **2**: 357, 1968.
9. Epstein, M. A.; Achang, B. G. & Barr, Y. M. — Virus particles in cultures lymphoblast from Burkett's lymphoma. *Lancet*, **1**: 702, 1964.
10. Fidler, H. K. — Cancer of the cervix. Epidemiologic cases report. *Obstet. Gynecol. Surv.* **24**: 731, 1969.
11. Huebner, R. J. & Todaro, J. G. — Daily Enterprise. March 30, 1972.
12. Huebner, R. J. & Todaro, J. G. — In Kiehl, L. F. — Colloquium Lepetit, Mexico, 1972 — Rassegna Medica Cultural, **11**: 29 1973.
13. Hutfield, D. C.; Wasley, G. D. & Gray, E. — Immunological and epidemiological investigation of genital strains of herpes simplex virus. *Br. J. Vener. Dis.* **43**: 48, 1967.
14. Kiehl, L. F. — IV Colloquium Lepetit, Mexico, nov 72. Rassegna Medica Cultural, **11**: 29, 1973.
15. Lundin Jr., F. E. — A critical evaluation of epidemiological methods in studying early cervical neoplasia. *Obstet. Gynecol. Surv.* **24**: 724, 1969.
16. Nahmias, A. J.; Dowdle, W. & Naib, Z. M. — Genital Infection with type 2 herpes virus hominis a common venereal disease. *Br. J. Vener. Dis.* **45**: 294, 1969.
17. Nahmias, A. J.; Josey, W. E. & Naib, Z. M. — Antibodies to herpes virus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. *Am. J. Epidemiol.* **91**: 547, 1970.
18. Naib, Z. M.; Nahmias, A. J.; Josey, W. E. & Kramer, J. H. — Genetical herpetic infections: association with cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, **23**: 940, 1969.
19. Pereyra, A. J. — The relationship of sexual activity to cervical cancer. *J. Obstet. Gynecol.* **17**: 154, 1961.
20. Rabson, A. S.; O'Connor, G. T. & Baron, S. — Morphologic, cytogenetic and virologic studies in vitro of a malignant lymphoma from an African child. *Int. J. Cancer*, **1**: 89, 1966.
21. Ramos Jr., J. — Oncologia clínica — S. Paulo. Sarvier, 1974.
22. Rawls, W. E.; Gardner, H. L. & Kaufman, R. L. — Antibodies to genital herpesvirus in patients with carcinoma of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **107**: 710, 1970.
23. Rawls, W. E. & Kaufman, R. H. — Herpesvirus y otros factores relacionados con la génesis del cáncer cervical. *Clin. Obstet. y Gynecol.*, Mexico, Interamericana, 1970.
24. Rawls, W. E.; Tompkins, W. A. & Melnick, J. L. — Association of herpesvirus type 2 and carcinoma of the uterini cervix. *Am. J. Epidemiol.* **89**: 547, 1969.
25. Rotkin, I. D. — Studies in inheritance of cancer of human uterini cervix. *Cancer*, **14**: 179, 1961.
26. Royston, I. & Aurelian, L. — Association of genital herpesvirus with cervical atypia and cancer in situ. *Am. J. Epidemiol.* **91**: 531, 1970.
27. Sprecher-Goldeberger, S.; Thiry, L. & Catoon, J. P. — Herpesvirus type 2 infection and carcinoma of the cervix. *Lancet*, **2**: 266, 1970.
28. Terris, M.; Wilson, E.; Smith, H.; Spring, E. & Nelson, T. H. — Carcinoma of the cervix. An epidemiologic study. *Am. J. Public. Health*, **57**: 840, 1967.
29. Wolinska, W. H. & Melamed, M. R. — Herpes genitalis in women attending planned parenthood of New York City. *Acta Cytol. (Philad)*. **14**: 239, 1970.

