

Estudio seroepidemiológico del virus *Herpes simplex* tipo 2 en mujeres adultas de Costa Rica

por

José Miguel Jiménez*, Luis Guillermo Fuentes**, Claudio Cordero ***
y Gerardo Alfaro****

(Recibido para su publicación el 22 de diciembre de 1978)

Abstract: The frequency of genital *Herpes simplex* type 2 infections in a group of twenty adult Costa Rican women was studied by isolation of the virus and the measurement of neutralizing antibody activity in sera. The virus could not be isolated in any of the vaginal secretions. Neutralizing antibody activity to herpes virus types 1 and 2 was found in sera from sixteen subjects. An antibody II/I index equal to or larger than 87, indicative of infection with *Herpes simplex* type 2 was found in fifty per cent of the population studied, a second segment was composed by the subjects with indices below 87. Evaluation of antibody activity to *Herpes simplex* type 2 revealed that: a) only a small percentage of the women lacked detectable antibody activity to the virus; b) there is a significant difference ($p < 0.005$) between the mean number of years of sexual experience among the two population segments; and c) there is a positive correlation ($p < 0.05$) between II/I index values and age among the women of the population segment with a II/I index equal to or larger than 87.

Los dos métodos más efectivos de control de natalidad utilizados hoy día, además de la cirugía, son los dispositivos intrauterinos (DIU) y las diferentes formas de píldoras anticonceptivas que introducen en el organismo equivalentes sintéticos de estrógenos y progesterona que evitan la ovulación. Mientras que los DIU son relativamente inocuos, las hormonas estrogénicas contenidas en las píldoras anticonceptivas pueden producir efectos secundarios indeseables (Elstein, 1973). Especial atención merecen las investigaciones que vinculan las hormonas estrogénicas con las infecciones virales y varias formas de cáncer (Thomas, 1972; Lyon, 1975).

Costa Rica es uno de los países latinoamericanos con mayor experiencia en programas de planificación familiar y del total de mujeres que planifican en el país, el 71 por ciento toma la píldora y un 12 por ciento usa DIU (Gómez & Salazar, 1976), desconociéndose hasta el momento la frecuencia de complicaciones en la salud de las usuarias de la píldora por carecerse de estudios al respecto.

* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

** Laboratorio de Virología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

*** Servicio de Endocrinología, Hospital México, Caja Costarricense de Seguro Social.

**** Servicio de Ginecología, Hospital México, Caja Costarricense de Seguro Social.

Los estudios epidemiológicos sugieren que el carcinoma cervical es iniciado por un agente transmitido por vía sexual, siendo más frecuente en mujeres con experiencia sexual precoz (Rotkin, 1967), o con múltiples cónyuges o compañeros (Martin, 1967). En cambio este tipo de cáncer es prácticamente desconocido entre mujeres célibes (Towne, 1955). El virus *Herpes simplex* tipo 2 es transmitido por vía sexual y sus anticuerpos han sido encontrados generalmente en mujeres con cáncer cervical (Plummer & Masterson, 1971; Adam *et al.*, 1972; Aurelian, 1973, 1976; Aurelian *et al.*, 1977; Figueroa & Zambrana, 1976). Investigaciones recientes indican que los anticuerpos neutralizantes para este tipo de virus se adquieren durante los primeros años de vida, siendo estas infecciones virales más frecuentes en las mujeres, por lo que se ha sospechado la posibilidad de que existan factores hormonales que facilitan la invasión celular del virus en el sexo femenino (Figueroa & Zambrana, 1976).

El presente estudio se llevó a cabo para determinar la presencia del virus *Herpes simplex* tipo 2 mediante su aislamiento en la secreción vaginal y la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de mujeres adultas costarricenses, antes de someterse a terapia anticonceptiva hormonal; forma parte de un proyecto de investigación cuya finalidad es estudiar en forma integral varios parámetros biomédicos que pueden ser afectados por el uso continuado de anticonceptivos hormonales orales.

MATERIAL Y METODOS

Características de la población: Veinte mujeres voluntarias adultas fueron reclutadas entre las estudiantes de la Universidad de Costa Rica y las pacientes de la Consulta Externa de Ginecología del Hospital México y de los servicios de Planificación Familiar de la Caja Costarricense de Seguro Social. Las voluntarias tenían entre 18 y 30 años de edad, con un mínimo de seis meses post-parto y sin tratamiento con anovulatorios hormonales ni con drogas, incluyendo tranquilizantes y un máximo de dos tabletas de aspirina por semana. Se les practicó un examen físico-ginecológico y una citología cervical y se excluyó del estudio a las que presentaron algún tipo de desorden ginecológico. A cada voluntaria se le asignó un número código y subsecuentemente toda la historia clínica fue designada con ese número. Durante la primera visita se sometió a cada voluntaria a un interrogatorio con un cuestionario estandarizado para obtener información relacionada con la edad, raza, estado civil, educación, ocupación, monto del ingreso familiar, edad a la menarca, edad a la primera relación sexual, edad al primer embarazo, número de embarazos y de hijos vivos.

Secreciones vaginales: Muestras de exudados vaginales fueron obtenidas de cada voluntaria mediante hisopos de algodón. Cada muestra fue suspendida en 2 ml de solución de Hanks complementada con 0,5 por ciento de albúmina bovina, 800 unidades de penicilina, 800 μ g de estreptomycin y 75 unidades de nistatina y dejada en reposo por 30 minutos a 4 C. Luego fueron congeladas a -80 C, manteniéndose así hasta que fueron cultivadas.

Sueros: Se obtuvieron muestras de sangre de cada voluntaria y los sueros fueron separados y mantenidos congelados a -80 C hasta el momento de ser analizados.

Cultivos celulares: Para el aislamiento del virus *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2) se utilizaron células de riñón de conejo y amnios humano. En un segundo intento

de aislamiento se utilizó células de riñón de conejo y la línea celular diploide de pulmón embrionario humano (HEL). El medio usado para los cultivos celulares fue el medio mínimo esencial de Eagle (MEM), complementado con 10 por ciento de suero de ternero, 0,11 por ciento de bicarbonato de sodio y 100 unidades de penicilina, y 100 μg de estreptomycin por mililitro.

Para el mantenimiento de las líneas celulares utilizadas en el aislamiento de los virus se usó el mismo medio pero complementado con 2 por ciento de suero y 0,22 por ciento de bicarbonato. Para las pruebas de neutralización se utilizó la línea celular VERO (riñón de mono verde), cultivadas en medio 199 complementado con 5 por ciento de suero de ternero, 0,22 por ciento de bicarbonato de sodio y 100 unidades de penicilina, y 100 μg de estreptomycin por mililitro. Las células fueron mantenidas en el mismo medio pero con sólo 2 por ciento de suero.

Virus: Se utilizó la cepa de *Herpes simplex* tipo 1, Lilly, y otra tipo 2, denominada Eva, aislada en nuestro laboratorio a partir de una lesión herpética del cérvix. Las cepas fueron identificadas como pertenecientes a los tipos 1 y 2 respectivamente, mediante pruebas biológicas establecidas (Figuroa & Rawls, 1969).

Aislamiento: Las muestras de exudados vaginales fueron inoculadas sin centrifugación previa en monocapas celulares de cada uno de los cultivos celulares utilizados para el aislamiento, permitiéndose un período de adsorción de 60 minutos antes de adicionar el medio de cultivo. Se incubó a 36 C durante 14 días y se observaron diariamente para determinar efecto citopático (ECP) típico. Los cultivos fueron realimentados cada dos días con medio de mantenimiento.

Neutralización: Los sueros fueron inactivados a 56 C por 30 minutos y se realizó posteriormente diluciones seriadas. A duplicados de cada una de las diluciones séricas se adicionó alícuotas de una suspensión conteniendo 100 TCID₅₀ del virus 1 ó 2; se agitaron e incubaron por un período de 60 minutos a 37 C. Transcurrido el período de incubación se inoculó la mixtura sobre monocapas de células VERO y se dejó adsorber por 90 minutos. Después de adicionar medio de mantenimiento los tubos se incubaron a 36 C por 6 días, con realimentaciones periódicas. En cada prueba se incluyó un control de virus sin suero y un control de células sin virus, además de una titulación regresiva para comprobar el título del virus.

Los títulos de anticuerpos se expresaron como el \log_{10} de sus valores. Los índices II/I fueron calculados mediante la fórmula propuesta por Rawls *et al.* (1970):

$$\text{Indice II/I} = \frac{\log_{10} \text{ del título de anticuerpos HSV-2}}{\log_{10} \text{ del título de anticuerpos HSV-1}} \times 100$$

Los índices II/I iguales o mayores a 87 se consideraron indicativos de una infección pasada o activa con HSV-2; las infecciones producidas por HSV-1 dan valores menores de 87 (Adam *et al.*, 1972).

Análisis de los datos: Se realizaron dos tipos básicos de análisis. Primero se hizo un análisis de los títulos de anticuerpos contra HSV-1 y HSV-2 y, segundo, se examinó la distribución de los anticuerpos entre la población usando los índices II/I que producen las mayores diferencias serológicas entre los dos grupos. La información obtenida en el presente estudio fue sometida a análisis estadístico, utilizando la prueba no paramétrica para muestras pequeñas de Kolmogorov-Smirnov (Siegel, 1975) y la prueba-t para medias. Los grados de correlación fueron calculados utilizando el programa de correlación HP-25 con una calculadora Hewlett-Packard 25.

RESULTADOS

Características poblacionales: El grupo de voluntarias que participó en el presente estudio constituye una pequeña porción de la población de mujeres costarricenses que planifican. Sin embargo, se puede considerar que este grupo posee características socio-económicas similares a las de la mayoría de las mujeres que frecuentan los servicios de planificación familiar del país. Un análisis de las características socio-económicas de las veinte voluntarias reclutadas en el presente estudio aparecen en el Cuadro 1. Cinco por ciento de las mujeres son menores de 20 años, 75 por ciento tenían de 20 a 25 años y 20 por ciento de 26 a 30 años de edad. La raza blanca (caucásica) es predominante en un 75 por ciento y el 25 por ciento restante fue catalogado como "mestizas". El 30 por ciento de la población es soltera. El nivel educativo está constituido por un 25 por ciento de mujeres con solamente educación primaria, 45 por ciento con secundaria y un 30 por ciento universitaria. La actividad ocupacional es variable, 10 por ciento manifestaron ser estudiantes, 50 por ciento laboran en oficios domésticos, 25 por ciento realizan actividades como obreras, en oficinas o en el comercio y un 15 por ciento son profesionales activas. Con referencia al nivel de ingreso familiar mensual de la población estudiada y de acuerdo con las normas establecidas por la Oficina de Estadística y Censos, el 75 por ciento de las mujeres pertenecen a hogares con un nivel de ingresos bajos y el 25 por ciento restantes a un nivel medio.

Aislamiento de HSV-2 y presencia de anticuerpos neutralizantes: En ninguna de las secreciones vaginales se aisló virus *Herpes simplex* tipo 2. En dieciséis sueros analizados se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes contra *Herpes simplex*. Los resultados de las titulaciones de los sueros por anticuerpos neutralizantes contra los dos tipos de virus se presentan en el Cuadro 2.

Presencia de anticuerpos contra HSV-2 y atributos poblacionales: El *Herpes simplex* tipo 2 es un virus transmitido sexualmente. El riesgo de adquirir una infección con este virus está asociado con atributos sexuales y reproductivos. El Cuadro 3 resume la información referente a títulos de anticuerpos, índices II/I, edad, edad en que se tuvo la primera relación sexual y el número de años de experiencia sexual de cada una de las mujeres estudiadas. Adoptando el criterio de que con base en los valores de los índices II/I se pueden catalogar las diferentes infecciones herpéticas (Rawls *et al.*, 1970; Adam *et al.*, 1972), la población estudiada se dividió en dos segmentos principales: el primer grupo comprende a las mujeres cuyos índices fueron menores de 87 y el segundo grupo reúne a las que poseen índices iguales o mayores de 87. Una evaluación de las diferencias entre las medias de los índices II/I, edad, edad de la primera relación sexual y del número de años de experiencia sexual entre los dos grupos de la población se presenta en el

Cuadro 4. Diferencias altamente significativas ($p < 0,005$) fueron observadas entre los índices II/I, así como entre el número de años de experiencia sexual.

Grados de correlación entre los índices y diferentes atributos poblacionales relacionados sexual y reproductivamente fueron analizados mediante el cálculo de los coeficientes de correlación respectivos. Un examen de los resultados obtenidos mostró que existe una asociación positiva ($r = 0,70$; $p < 0,05$) entre los índices y la edad de las mujeres del grupo 2 de la población.

CUADRO 1

Características socio-económicas de las veinte voluntarias reclutadas

Atributo	Componentes	No.	%
Edad	19 años	1	5,0
	20 a 25	15	75,0
	26 a 30	4	20,0
Raza	Blanca	15	75,0
	Mestiza	5	25,0
Estado civil	Solteras	6	30,0
	Casadas	14	70,0
Educación	Primaria	5	25,0
	Secundaria	9	45,0
	Universitaria	6	30,0
Ocupación	Estudiante	2	10,0
	Oficios domésticos	10	50,0
	Obrera/oficina/comercio	5	25,0
	Profesional	3	15,0
Nivel de ingreso familiar mensual	≤ $\text{C} 2.000,00$	15	75,0
	$\text{C} 2.001,00$ a $\text{C} 5.599,00$	5	25,0

DISCUSION

El análisis estadístico con la prueba de Kolmogorov-Smirnov demostró que no existe una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos neutralizantes contra HSV-2 en los sueros de las mujeres estudiadas y los diferentes atributos poblacionales considerados, debido, probablemente, al tamaño pequeño de la población analizada en el presente estudio.

Seroepidemiológicamente es difícil diferenciar infecciones por HSV-1 o HSV-2, ya que la respuesta inmunitaria a los dos tipos de virus no es independiente

y por el contrario parece estar determinada por la experiencia total previa con ambos virus (Adam *et al.*, 1972). En general, una infección con el tipo 1 ó 2 confiere anticuerpos contra los dos, pero con un título mayor para el virus homólogo (Figueroa & Zambrana, 1976). Con base en los estudios realizados por Rawls *et al.*, (1970) y en el criterio adoptado por Adam *et al.* (1972) y por Figueroa & Zambrana (1976), de que infecciones virales herpéticas con índices II/I mayores de 87 son debidas a *Herpes simplex* tipo 2, nuestros resultados demuestran la presencia de anticuerpos HSV-2 en el 50% de la población estudiada, lo que sugiere la posibilidad de una alta incidencia de infecciones herpéticas genitales asintomáticas o silenciosas en la población costarricense que podría constituir un problema de Salud Pública.

CUADRO 2

*Presencia de anticuerpos neutralizantes contra Herpes simplex en dieciseis de las mujeres estudiadas **

Código	Anticuerpos contra <i>Herpes simplex</i>				
	Tipo 1		Tipo 2		INDICE II/I
	Título	Log ₁₀	Título	Log ₁₀	
H.A.M.	1:160	2,2	1:10	1,0	45
V.M.M.F.	1:80	1,9	1:10	1,0	53
V.CH.J.	1:80	1,9	1:20	1,3	68
M.G.E.	1:80	1,9	1:20	1,3	68
J.M.O.	1:80	1,9	1:40	1,6	84
U.C.N.	1:160	2,2	1:80	1,9	86
V.C.L.M.	1:160	2,2	1:80	1,9	86
H.A.S.M.	1:160	2,2	1:80	1,9	86
A.C.G.	1:80	1,9	1:80	1,9	100
L.O.M.A.	1:80	1,9	1:80	1,9	100
M.M.Y.	1:160	2,2	1:160	2,2	100
G.L.S.	1:160	2,2	1:160	2,2	100
G.G.Z.	1:160	2,2	1:160	2,2	100
H.O.M.R.	1:160	2,2	1:160	2,2	100
V.F.E.	1:80	1,9	1:320	2,5	131
B.C.J.	1:20	1,3	1:160	2,2	169

* Se incluyó sólo a las mujeres que se hicieron todos los exámenes.

Una evaluación de la actividad de los anticuerpos contra HSV-2 en la población estudiada revela lo siguiente:

- a) Solamente un pequeño porcentaje de las mujeres estudiadas carece de títulos detectables contra HSV-2.

- b) La diferencia altamente significativa ($p < 0,005$) entre las medias del número de años de experiencia sexual de los dos segmentos de la población sugiere que la probabilidad de adquirir una infección o reinfección con HSV-2 depende de la experiencia sexual de las mujeres y específicamente del número de años con relaciones sexuales activas.
- c) En el segmento de la población cuyos índices II/I fueron mayores de 87 se observó una correlación positiva al nivel del 5 por ciento entre los valores de los índices y la edad de las mujeres. Esta observación coincide con resultados de investigaciones previas que sugieren que los anticuerpos contra HSV se adquieren a temprana edad y que los títulos para el tipo 2 aumentan con la edad (Adam *et al.*, 1972; Figueroa & Zambrana, 1976).

CUADRO 3

*Presencia de anticuerpos contra Herpes simplex y su relación con la edad, edad a la primera relación sexual y número de años de experiencia sexual en dieciseis de las mujeres estudiadas **

Código	Anticuerpos contra <i>Herpes simplex</i> **		Índice II/I	Edad, años	Edad a la primera relación sexual, años	Número de años de experiencia sexual
	Tipo 1	Tipo 2				
H.A.M.	2,2	1,0	45	24	22	2
V.M.M.F.	1,9	1,0	53	25	23	2
V.CH.J.	1,9	1,3	68	23	21	2
M.G.E.	1,9	1,3	68	21	20	1
J.M.O.	1,9	1,6	84	23	23	0
U.C.N.	2,2	1,9	86	21	20	1
V.C.L.M.	2,2	1,9	86	25	25	0
H.A.S.M.	2,2	1,9	86	21	18	3
A.C.G.	1,9	1,9	100	22	18	4
L.O.M.A.	1,9	1,9	100	24	20	4
M.M.Y.	2,2	2,2	100	18	17	1
G.L.S.	2,2	2,2	100	20	16	4
G.G.Z.	2,2	2,2	100	21	18	3
H.O.M.R.	2,2	2,2	100	24	19	5
V.F.E.	1,9	2,5	131	21	20	1
B.C.J.	1,3	2,2	169	29	25	4

* Se incluyó sólo a las mujeres que se hicieron todos los exámenes.

** Se expresan como los valores Log_{10}

Significación de las diferencias entre las medias de los índices II/I, edad, edad a la primera relación sexual y del número de años de experiencia sexual entre los dos segmentos de la población estudiada

Atributo	Segmentos de la población según el valor del índice II/I		t	p
	Grupo 1 (<87)*	Grupo 2 (>87)*		
Indíces II/I	72,00 ± 16,27	112,50 ± 25,28	3,70	<0,005
Edad	22,88 ± 1,73	22,38 ± 3,34	N.S.	N.S.
Edad a la primera relación sexual	21,50 ± 2,20	19,13 ± 2,75	1,85	0,05
Número de años de experiencia sexual	1,38 ± 1,06	3,25 ± 1,49	3,65	<0,005

* Media y desviación estándar.

Los estudios epidemiológicos del *Herpes simplex*, sugieren que la mayoría de las infecciones herpéticas genitales son asintomáticas o silenciosas. Los resultados de nuestro estudio parecen confirmar esta observación. Esto es extremadamente importante dado que se ha establecido una asociación entre el *Herpes simplex* tipo 2 y el cáncer del cérvix uterino, aunque no es claro aún, si la relación es causal o si el tejido canceroso es más susceptible a la invasión por este virus.

Experimentalmente se ha demostrado la presencia de anticuerpos neutralizantes contra HSV-2 en sueros de mujeres con carcinoma invasivo del cérvix y se ha logrado también aislar en algunos casos, el virus de sus secreciones genitales (Figueroa & Zambrana, 1976); sin embargo, el virus infeccioso no ha sido detectado aún en los tejidos neoplásicos cervicales aunque los antígenos virales sí han sido demostrados en las células cervicales exfoliadas (Aurelian, 1973).

En Costa Rica el cáncer cervical tiene una incidencia aparentemente alta; si a esto le sumamos una alta frecuencia de posibles infecciones silenciosas genitales debidas a *Herpes simplex* tipo 2, el problema de salud pública que esto podría representar merece ser considerado cuidadosamente. La continuación del presente estudio nos permitirá determinar en un futuro próximo, si el uso continuado de drogas que modifican procesos fisiológicos normales como son los anovulatorios hormonales orales, tienen alguna influencia en la epidemiología viral del *Herpes simplex* tipo 2 y del cáncer cervical.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias a los auspicios del International Development Research Centre del Canadá (asignación OC/Health [Costa Rica] 3-P-76-0173), de la Universidad de Costa Rica y del Centro de Docencia e Investigación de la Caja Costarricense de Seguro Social. Fue realizado en la Unidad de Biología de la Reproducción del Centro de Docencia e Investigación, en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología y en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. Deseamos expresar nuestro agradeci-

miento a la señora Ana María Jiménez M., por su ayuda como Asistente de Investigación; al Dr. Ramiro Barrantes M., por su valiosa colaboración en el análisis estadístico y por las sugerencias y revisión del manuscrito original y a la Sra. Nora María Rojas M., por su trabajo de mecanografía.

RESUMEN

La frecuencia de infecciones herpéticas genitales producidas por *Herpes simplex* tipo 2, fue estudiada en un grupo de veinte mujeres adultas costarricenses mediante el aislamiento del virus en el tracto genital y la detección de anticuerpos neutralizantes en el suero. El virus no pudo ser aislado en ninguno de los casos. En dieciséis sueros analizados se demostró la presencia de anticuerpos contra *Herpes simplex* tipos 1 y 2. Un índice de anticuerpos II/I igual o mayor a 87, que indica una infección con *Herpes simplex* tipo 2, se encontró en el 50 por ciento de la población estudiada, un segundo grupo fue compuesto por las mujeres con índices inferiores a 87. Una evaluación de la actividad de los anticuerpos en la población contra *Herpes simplex* tipo 2 reveló que: a) solamente un pequeño porcentaje de las mujeres estudiadas carece de títulos detectables contra el virus; b) existe una diferencia altamente significativa ($p < 0,005$) entre las medias del número de años de experiencia sexual de las mujeres de los dos segmentos de la población; y c) existe una correlación positiva ($p < 0,05$) entre los valores de los índices II/I y la edad de las mujeres del segmento de la población cuyos índices II/I fueron iguales o mayores a 87.

REFERENCIAS

- Adam, E., R.H. Kaufman, J.L. Melnick, A.H. Levy, & W.E. Rawls
1972. Seroepidemiologic studies of Herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. III. Houston, Texas. Amer. J. Epidemiol., 96: 427-442.
- Aurelian, L.
1973. Virions and antigens of *Herpes simplex* type 2. Symposium: herpesvirus and cervical cancer. Cancer Res., 33: 1539-1547.
- Aurelian, L.
1976. Sexually transmitted cancers? The case for genital herpes. J. Amer. Vener. Dis. Ass., 2: 10-20.
- Aurelian, L., B.C. Strnad, & M.F. Smith
1977. Immunodiagnostic potential of a virus-coded tumor-associated antigen (AG-4) in cervical cancer. Cancer, 39: 1834-1849.
- Elstein, M.
1973. The present status of contraception, p.298. In E.A. Banner & A.V. Greeley (eds.). The Searle Review of Obstetrics and Gynecology Literature. Science & Medicine Publishing Co., Inc. New York.
- Figueroa, M., & W.E. Rawls
1969. Biological markers for the differentiation of *Herpes*-virus strains of oral and genital origin. J. Gen. Virol., 4: 259-267.

- Figuroa, M., & A. Zambrana
1976. El herpes genital en Honduras y su relación con el carcinoma del cervix uterino. Rev. Lat-amer. Microbiol., 18:111-116.
- Gómez, M., & J.M. Salazar
1976. Sexto Seminario Nacional de Demografía. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Lyon, F.A.
1975. The development of adenocarcinoma of the endometrium in young women receiving long-term sequential oral contraception. Amer. J. Obstet, Gynec., 123:299-301.
- Martin, C.E.
1967. Epidemiology of cancer of the cervix. Marital and coital factors in cervical cancer. Amer. J. Publ. Hlth., 57:803-814.
- Plummer, G., & J. G. Masterson
1971. *Herpes simplex* virus and cancer of the cervix. Amer. J. Obstet. Gynec., 111: 81-84.
- Rawls, W.E., K. Iwamoto, E. Adam, & J.L. Melnick
1970. Measurement of antibodies to Herpesvirus types 1 and 2, in human sera. J. Immunol., 104:599-606.
- Rotkin, L.D.
1967. Epidemiology of cancer of the cervix. Sexual characteristics of a cervical cancer population. Amer. J. Publ. Hlth., 57:815-829.
- Siegel, S.
1975. Estatística não-paramétrica para as Ciências do Comportamento. Traducido al Portugués por Alfredo Alves de Faries, McGraW-Hill do Brasil, Ltda. São Paulo. 350 p.
- Thomas, D.B.
1972. Relationship of oral contraceptives to cervical carcinogenesis. Obstet. Gynec., 40: 508-518.
- Towne, J.E.
1955. Carcinoma of the cervix in nulliparous and celibate women. Amer. J. Obstet. Gynec., 69:606-611.