

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO
(HPV) E *Chlamydia trachomatis* (CT) E SUA
ASSOCIAÇÃO COM LESÕES CERVICAIS EM UMA
AMOSTRA DE MULHERES ASSINTOMÁTICAS DE
PORTO ALEGRE, BRASIL**

Dissertação de Mestrado

Cristine Nascente Igansi

PORTO ALEGRE

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO
(HPV) E *Chlamydia trachomatis* (CT) E SUA
ASSOCIAÇÃO COM LESÕES CERVICAIS EM UMA
AMOSTRA DE MULHERES ASSINTOMÁTICAS DE
PORTO ALEGRE, RS**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do Título de Mestre em
Epidemiologia.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mary Clarisse Bozzetti

PORTO ALEGRE

2005

A Deus, por tudo.

Aos meus Queridos Pais e Irmãos, pela família, educação, incentivo, paciência e compreensão nos momentos de minha ausência durante este período. Amo Vocês!

Ao meu Querido Henrique, pelo seu amor, incentivo, carinho, amizade e compreensão. Te Amo Muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma me ajudaram e contribuíram para esta dissertação de mestrado, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia por esta oportunidade e aos professores deste PPG pelos ensinamentos.

À Querida Professora Doutora Mary Clarisse Bozzetti por ter acreditado neste trabalho, pelo indispensável apoio e ensinamento, pela orientação nesta caminhada, pela dedicação, carinho e amizade.

À amiga e colega de Laboratório Daniela Becker, pelo incentivo, colaboração e dedicação em todos os momentos.

À querida e indispensável amiga e colega de Laboratório Regina Bones Barcellos, pela sua grande participação neste estudo, dedicação, apoio e pelos momentos de alegria e companheirismo.

À amiga e colega Marilda Mar da Rosa, por todos os momentos vivenciados juntos desde o início de nossas caminhadas!

À colega e amiga Viviane Kubisszewski, pela compreensão e dedicação em todos os momentos.

Às colegas e amigas Sabrina Almeida, Cíntia Costi e Elis Regina Dalla Costa pelos conselhos e colaboração em todos os momentos.

Ao CDCT/FEPPS, em especial às Queridas Doutoradas Maria Lúcia Rossetti, Elizabeth Cortez-Herrera, Rosa Dea Sperhacke e Márcia Susana Nunes Silva, pela amizade, orientação e por terem me acolhido no Laboratório e acompanhado toda minha trajetória.

À equipe do Posto Jardim Leopoldina, que participa neste projeto, obrigada pela oportunidade de realização do estudo o qual contribuirá com importantes pesquisas e benefícios na Saúde Pública.

Às mulheres participantes do estudo, pois sem elas este trabalho não seria possível.

Enfim a todas as pessoas que talvez eu possa ter esquecido de agradecer.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS.....	11
RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	17
1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
1.3. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL.....	22
1.4. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	24
1.5. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV.....	25
1.5.1. Organização Genômica do Vírus	25
1.5.2. Expressão Gênica Viral e Câncer Cervical.....	27
1.5.3. Ciclo Fisiopatológico do HPV.....	29
1.6. <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT).....	33
1.7. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE HPV E <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
1.8. VIAS DE TRANSMISSÃO DE HPV E <i>Chlamydia trachomatis</i>	39
1.9. PREVENÇÃO E TRATAMENTO	40
1.10. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV	42
1.10.1. MÉTODOS INDIRETOS.....	43
1. Detecção clínica.....	43
2. Exame Cito-Histológico (CP).....	43
3. Exame Colposcópico.....	44
4. Sorologia.....	45
1.10.2. MÉTODOS DIRETOS.....	46
1. Hibridização Southern.....	46
2. Hibridização in situ (HIS).....	48
3. Captura Híbrida (DIGENE II).....	48
4. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	50
5. Exame imunohistoquímico (IH).....	52
1.11. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>Chlamydia trachomatis</i>	53
1. Cultivo Celular.....	54
2. Pesquisa Direta de Antígenos	55
3. Pesquisa de Anticorpos Específicos.....	56

1.11.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i>	57
1. Hibridização de Ácidos Nucléicos.....	58
2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	58
3. Captura Híbrida (<i>Digene</i>).....	61
OBJETIVOS DO ESTUDO.....	63
CONCLUSÕES.....	64
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
Artigo.....	86
Resumo.....	88
Abstract.....	90
Introdução.....	92
Materiais e Métodos.....	94
Resultados.....	101
Discussão.....	103
Referências Bibliográficas.....	110
Anexos	
I. Objetivos do Estudo Mãe "Distribuição de Papilomavírus Humano Oncogênicos e sua Associação com lesões de colo uterino.....	125
II. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição CEP/GHC.....	126
III. Ficha de Coleta de Dados.....	127
IV. Termo de Consentimento Informado.....	132
V. Fluxograma de Seguimento das Participantes do Estudo.....	138
VI. Trabalhos Apresentados em Congressos e Artigo submetido para Publicação, decorrentes do presente estudo.....	139
VII. Projeto de Pesquisa.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
AGUS	Atipia Glandular de Significado Indeterminado
ASCUS	Atipia Escamosa de Significado Indeterminado
ATP	Trifosfato de adenosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CMV	Citomegalovírus
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
DST	Doença Sexualmente Transmissível
E1-E7	Regiões Precoces do Genoma Viral
EB	Corpo elementar de <i>Chlamydia trachomatis</i> na forma infecciosa extracelular
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EIE	Enzimaímuensaio (Teste de Elisa)
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
FC	Fixação do complemento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
fg	fentogramas
GHC	Grupo Hospitalar Conceição
h	Horas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HGSIL (LIEAG)	<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HPV	Papilomavírus Humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFD	Imunofluorescência Direta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1/L2	Proteínas Tardias que compõem o Capsídeo Viral
LACEN	Laboratório Central do Estado
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região regulatória)
LGSIL (LIEBG)	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mAmp	Miliampere
mg	miligrama
MIF	Microimunofluorescência
min	Minutos
mL	mililitros
mM	Milimolar
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i> (Proteína Majoritária de Membrana)
NAATs	Testes de amplificação de ácidos nucleicos
ng	nanogramas
NIC I-II-III	Neoplasia Intraepitelial Cervical (Graus I, II e III)

OR	<i>ODDS RATIO</i> (razão de chances)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de Leitura Aberta)
p53	Gene constitutivo do genoma humano protetor à indução do câncer
pb	Pares de Bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pmol	picomol
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RB	Corpo reticular de <i>Chlamydia trachomatis</i> na forma replicativa metabólica não-infecciosa
RC	Razão de Chances
RLU	Unidade Relativa de Luminescência
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
s	segundos
SD	Desvio Padrão
SES	Secretaria Estadual da Saúde
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (lesão intraepitelial)
TEB	Tris borato-EDTA
TMA	Reação de amplificação mediada pela transcrição
UFI	Unidade formadora de inclusão
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sil
UV	Ultravioleta
V	Volts
VLP	<i>Virus Like Particles</i> - Partículas Virais
W	Watts

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS

Figuras da Dissertação

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR) (Howley PM *et al.*, 1996).....26

Figura 2. Fase de proliferação de células infectadas por HPV e formação do papiloma (Bosch FX *et al.*, 1995) 32

Tabelas da Dissertação

Quadro 1. Relação entre os sorotipos, o sexo acometido e as doenças causadas por *Chlamydia trachomatis*.....34

Quadro 2. Comparação entre as técnicas de diagnóstico para HPV.....52

Lista de Tabelas do Artigo

Tabela 1. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de HPV e *Chlamydia trachomatis*.....117

Tabela 2. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de Co-Infecção por HPV e CT.....119

Tabela 3. Distribuição das variáveis citológicas, colposcópicas e anatomopatológicas de acordo com a presença de HPV, de <i>Chlamydia trachomatis</i> e Co-Infecção.....	121
Tabela 4. Razões de Chance Ajustadas e IC 95% da Associação Entre as Variáveis Estudadas e a presença de HPV, de <i>Chlamydia trachomatis</i> e Co-Infecção.....	122
Tabela 5. Comparação das Variáveis do estudo Atual com Achados de Outros Estudos.....	123
Figura 1. Distribuição de HPV e <i>Chlamydia trachomatis</i> em diferentes faixas etárias.....	124

RESUMO

O câncer cervical acomete anualmente cerca de 470.000 mulheres em todo o mundo e mais de 16.000 mulheres no Brasil. O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação ao Papilomavírus Humano (HPV) estão bem documentados, sendo este o fator principal para o desenvolvimento do câncer cervical.

A infecção genital por *Chlamydia trachomatis* é estudada como um co-fator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV.

Este estudo tem como objetivo conhecer a prevalência de infecção por HPV e *Chlamydia trachomatis* em uma amostra de mulheres assintomáticas de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre, bem como verificar as características associadas à presença desta co-infecção e sua relação com lesões cervicais.

Trata-se de um estudo transversal cujo desfecho é a positividade ao HPV e à *Chlamydia trachomatis* em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre. Um total de 1217 amostras de material do colo do útero foi coletado para realização do exame citopatológico e para a identificação do DNA-HPV e DNA-CT através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Colposcopia e biópsia foram realizadas sempre que a citologia estivesse alterada e/ou a PCR para o HPV-DNA fosse positiva. A prevalência de HPV e *Chlamydia trachomatis* e sua distribuição por faixa etária são descritas, bem como a sua associação com as variáveis estudadas através das Razões de Chances (RC) estimadas por regressão logística múltipla.

Observou-se uma prevalência de HPV-DNA de 28,4% (n=346/1217), de CT-DNA de 12,6% (n=152/1208) e de co-infecção por HPV e CT de 6,5% (n=78/1208). Mulheres não brancas (Razão de Chance (RC) =1,60; Intervalo de Confiança (IC) de 95%:1,10-2,38),

assalariadas (RC=1,74; IC95%:1,17-2,60) e com parceiro apresentando história de condiloma genital (RC=2,35; IC95%:1,17-4,72) mostraram-se associadas com a positividade para HPV. A infecção por CT mostrou uma associação positiva com mulheres que iniciaram a vida sexual antes dos vinte anos (RC=1,82; IC95%:1,05-3,15) e assalariadas (RC=1,93; IC95%:1,15-3,25). Quanto à co-infecção por HPV e CT, mulheres com mais de três de parceiros sexuais na vida (RC=2,02; IC 95%:1,12-3,65) apresentaram uma associação positiva com o desfecho. Com relação à citologia, tanto a infecção por HPV quanto a co-infecção apresentaram associação significativa com anormalidades citológicas ($p \leq 0.001$).

Os resultados mostraram uma elevada prevalência de HPV, de CT e de co-infecção em uma amostra de mulheres assintomáticas reforçando dados relatados na literatura. A associação destas infecções com variáveis sócioeconômicas, de comportamento sexual e com lesões do colo uterino, indicam a importância de medidas para a promoção e prevenção de saúde com este alvo específico dentro da rotina de serviços de atenção primária. Desta forma, acredita-se que estes dados possam ser muito úteis no planejamento de programas, incluindo o controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis e a utilização de vacinas para o HPV.

INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) são responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis (DST) tipo-específicas, que infectam a pele, mucosas e o trato genital, causando lesões, tanto benignas como malignas (1). Estas DST frequentemente acometem a população sexualmente ativa, entre 15 e 49 anos de idade (2). Em 1996, estimavam-se entre 500 mil a um milhão de casos novos, por ano, de infecção pelo HPV, 834.555 de *Chlamydia trachomatis*, 200.000 a 500.000 de herpes, 100.000 de sífilis e 800.000 de gonorréia (3).

Segundo Franco *et al* (2001), a infecção pelo HPV é considerada a causa principal dos casos de câncer cervical e de uma pequena fração dos casos de câncer vaginal, vulvar, peniano e anal. Além do HPV, diversos estudos estão considerando a *Chlamydia trachomatis* como um co-fator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV. Epidemiologistas continuarão concentrando seus estudos em câncer cervical, devido à sua prevalência global e à disponibilidade de excelentes modelos epidemiológicos de carcinogênese (5, 6, 7, 8).

O câncer cervical é um dos tumores malignos mais frequentes na população brasileira, apontando apenas o câncer de mama e de pele não-melanoma com índices mais elevados. Dados absolutos sobre incidência e mortalidade por câncer cervical do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apresentaram para 2003, uma expectativa de 16.480 novos casos e 4.110 óbitos (9).

A prevenção primária de câncer cervical pode ser realizada com sucesso através de programas de conscientização e controle da infecção pelo HPV.

Atualmente, poucas evidências indicam que os tratamentos disponíveis no momento erradicam ou afetam a história natural das infecções pelos papilomavírus e nenhum dos tratamentos é superior aos outros, ou seja, cada caso deverá ser avaliado decidindo a conduta mais adequada (10).

Estratégias de promoção da saúde orientam para uma avaliação e mudança no comportamento sexual que poderá ser efetivo na prevenção de infecção pelo HPV genital.

Portanto, é cada vez maior o interesse na detecção e identificação do HPV e *Chlamydia trachomatis* na infecção genital e em lesões precoces do colo uterino, na perspectiva de uma atuação mais ampla em nível da prevenção primária até o desenvolvimento de vacinas específicas para minimizar ou evitar a co-infecção por HPV e *Chlamydia trachomatis* (11).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO

As taxas de aquisição de infecções por papilomavírus humano (HPV) são elevadas, principalmente em adultos jovens sexualmente ativos (12). A estimativa da prevalência das infecções entre mulheres no mundo varia de 2,0% a 44,0% devido a diferenças nas faixas etárias das populações estudadas, pelo comportamento sexual diversificado entre as populações e pela sensibilidade dos métodos diagnósticos utilizados para a detecção da infecção por HPV (13).

Os papilomavírus são classificados como HPV de baixo risco (subtipos -6, -11, -26, -42, -43, -44, -54, -70, -73) ou de alto risco (subtipos -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, -68), de acordo com o seu potencial oncogênico. Segundo Kulasingam (2002), a prevalência de infecções por HPV de alto risco em uma população dos Estados Unidos com idade de 25 anos foi de 27,4%. Entretanto, um recente estudo na Escócia com mulheres de idade ao redor de 36 anos demonstrou uma prevalência de aproximadamente 20,5% para todos os tipos de HPV e 15,7% para HPV de alto risco (15).

O HPV-16 é um dos tipos de alto risco mais comum entre mulheres, e também o subtipo mais freqüente entre os casos de câncer cervical, com taxas entre 24,3% em mulheres com idade média de 16 anos e 23,7% em mulheres com 25 anos (16, 17, 18, 19). O subtipo HPV-18, também classificado como de alto risco, apresenta taxas de prevalência de 7,3% em mulheres com idade ao redor de 16 anos e 7,2% em mulheres com idade ao redor de 25 anos.

Nos Estados Unidos, entre 1966 e 1984, ocorreu um acréscimo de 450,0% no número de casos de verrugas anogenitais (12).

Na Finlândia, em um estudo realizado com soro de mulheres grávidas, foi verificado um acréscimo na prevalência de infecções por HPV-16 de 17,0% em 1983 a 1985 para 24,0% em 1995 a 1997, com idade entre 23 a 31 anos (20). Já na Alemanha, a prevalência de infecções por HPV-16 teve um acréscimo de 16,0% para 21,0% entre 1969 e 1980 (21).

Em muitos estudos realizados, a incidência de infecções com subtipos de HPV oncogênicos apresenta-se mais elevada que a incidência de infecções com subtipos não-oncogênicos (17, 18, 22, 23).

Na Inglaterra, a incidência cumulativa de infecção por HPV entre mulheres com idade entre 15 a 19 anos aumentou 44,0% em um período de três anos (1988-1991) (24).

Segundo Laukkanen (2003), entre os períodos de 1983-1985 e 1992-1994, a incidência de HPV-16 entre mulheres de idade igual ou menor que 22 anos decresceu de 25/1000 pessoas-ano para 13/1000 pessoas-ano, porém houve um acréscimo para 31/1000 pessoas-ano durante 1995-1997. E para mulheres com idade de 23 a 31 anos, entre 1983-1985 e 1995-1997, a incidência da infecção por HPV-16 apresentou elevação, passando de 5/1000 para 13/1000 pessoas-ano.

No Brasil, para o ano de 2005, são estimados 20.690 novos casos (22,1/100.000 mulheres) de câncer de colo uterino e, para o Rio Grande do Sul, neste mesmo ano, 1.880 novos casos (33,7/100.000 mulheres) (10).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis é uma bactéria intracelular, gram-negativa, obrigatória e sexualmente transmissível, que infecta células epiteliais humanas do trato genital e ocular,

sendo, portanto, responsável por uma vasta variedade de desordens celulares, incluindo lesões cervicais (26).

Infecções por *Chlamydia trachomatis* apresentam altas taxas de prevalência no mundo e 70,0% a 80,0% dos casos são assintomáticos e freqüentemente não são detectados (27).

A infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis* é um grande problema de saúde pública, sendo considerado a maior causa de morbidade em indivíduos sexualmente ativos, com uma estimativa de 89 milhões de novos casos ocorrendo anualmente em todo o mundo, sendo que indivíduos não tratados servem como reservatório para a transmissão da infecção aos parceiros sexuais (28, 29).

Nos Estados Unidos, desde 1990, vigora a lei de notificação compulsória de casos de infecção por *Chlamydia trachomatis*. No ano de 2002, foram reportados 834.555 casos (296,5 casos/100.000 habitantes). Se o aumento do número de casos reportados, ano após ano desde 1987 reflete, por um lado, a expansão dos programas de triagem e de notificação naquele país e o desenvolvimento e o uso de testes diagnósticos mais sensíveis, verifica-se por outro lado, que as taxas de infecção permanecem altas (30).

No Brasil, a infecção por clamídia não é uma doença de notificação compulsória. Alguns estudos de prevalência vêm sendo conduzidos isoladamente em populações específicas, utilizando-se testes moleculares para a detecção de *Chlamydia trachomatis*, os quais permitem a realização de triagens populacionais.

Ramos e colaboradores (2003) realizaram um estudo de base populacional em mulheres residentes em uma vila popular da cidade de Porto Alegre (RS), que revelou uma baixa prevalência, da ordem de 0,59%. O mesmo grupo, no entanto, pesquisando 79 pacientes masculinos de uma clínica de DST, obteve positividade para *Chlamydia trachomatis* em 41,9% dos casos (32).

Um outro estudo de base populacional realizado na cidade de Vitória (ES) em mulheres adolescentes sexualmente ativas constatou a prevalência de 12,2% neste grupo (33).

Na cidade de Manaus, a prevalência estimada em 121 amostras de pacientes femininas de um serviço de DST foi de 20,7% (34).

Atualmente, está em andamento no país um estudo de âmbito nacional de prevalências e freqüências relativas das principais doenças sexualmente transmissíveis (DST). Os resultados parciais estimam a prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres sexualmente ativas da ordem de 2,2%. Em homens, esta prevalência seria 4,5% e em gestantes de 6,3% (dados não publicados, fonte: Ministério da Saúde, 2004).

Diversas infecções podem ocorrer devido à presença de *Chlamydia trachomatis*, como tracomas e conjuntivites. Recém-nascidos de parto normal de mães com infecção genital por *Chlamydia* podem sofrer de conjuntivite neonatal e pneumonia (27). Atualmente estão descritos diversos sorotipos, sendo que os sorotipos D a K de *Chlamydia* são os mais associados com doenças sexualmente transmissíveis (DST). Estudos epidemiológicos têm apresentado a prevalência da bactéria em 5,0% da população geral, sem queixas ginecológicas; entretanto, em pacientes com suspeita de alguma doença sexualmente transmissível (DST), a freqüência é relatada entre 20,0% a 40,0% de positividade (35).

Observações clínicas realizadas desde 1970 indicam que a infecção genital por *Chlamydia trachomatis* é estudada como um co-fator no desenvolvimento de NICs e outras alterações celulares significativas em mulheres com história de infecção por HPV, resultando também em cervicites mucopurulentas crônicas, uretrites, doença inflamatória pélvica (18,0% a 24,0%) e endometriose (6,0% a 21,0%) (5, 6, 7).

Na Colômbia e Filipinas há poucos estudos de co-infecções de Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* (6).

Na Índia, as DST e cânceres anogenitais são um dos maiores problemas de saúde pública em mulheres. Anualmente, aproximadamente 100.000 mulheres desenvolvem câncer cervical e 40,0% a 50,0% são infectadas com uma ou outra doença sexualmente transmissível (27). Em mulheres assintomáticas, cerca de 30% a 81% apresentaram resultados positivos em sorologia para *Chlamydia trachomatis* (27).

Um estudo realizado por Kahn (2005), entre 1997 a 2002 nos Estados Unidos, demonstrou uma prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em 15,6% das 33.619 mulheres e 5,9% dos 98.296 homens atendidos, sendo que 54,0% das mulheres e 51,0% dos homens estavam co-infectadas por *Neisseria gonorrhoea*.

Segundo de Lima Soares (2003), em um estudo realizado em Alagoas, Brasil, das 341 mulheres arroladas, 6,4% apresentavam resultados confirmatórios para infecção por *Chlamydia trachomatis* e 26,6% resultado positivo para infecção por Papilomavírus Humano.

Recentes estudos epidemiológicos, baseados na detecção de *Chlamydia trachomatis* a partir de tipos específicos de anticorpos no soro sanguíneo, têm demonstrado que a infecção por esta bactéria aumenta o risco de câncer cervical invasivo entre mulheres HPV positivas (6, 26, 38).

O grupo demográfico mais freqüentemente acometido pela infecção clamidial é o de mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 20 anos. A prevalência nestes grupos excede os 10,0% podendo atingir índices de 40,0% em clínicas de DST. Um dos fatores mais notórios para explicar estes resultados são as diferenças anatômicas na cérvix uterina de mulheres jovens, favorecendo a exposição ao agente etiológico. Outras variáveis associadas à infecção por *Chlamydia* incluem nuliparidade, ser solteira, raça negra e baixa condição sócio-econômica, bem como a não utilização de preservativos nas relações sexuais e infecções gonocócicas concomitantes (39).

Além disso, infecções por *Chlamydia trachomatis* estão associadas ao risco aumentado de transmissão do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Isto se dá pela reação inflamatória causada pela infecção clamidial que promove o acesso de linfócitos CD4 (alvo do vírus HIV) ao local. A concomitância de infecção clamidial e pelo HIV também resulta em aumento da replicação viral (40). De um modo geral, infecções do trato genital aumentam o risco de aquisição do HIV e outras DST em cerca de 10 vezes. Por outro lado, a prevenção e o tratamento das DST podem reduzir a infecção pelo HIV em 40,0% (41, 42).

1.3. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL

O câncer é o resultado de um acúmulo de eventos que interferem nas funções essenciais da célula, processo este que pode durar longos períodos de tempo (43).

O câncer cervical foi a causa mais comum de mortes por câncer nos Estados Unidos em 1930. Com a introdução de testes de rastreamento, como o *Papanicolaou* (CP), a detecção precoce e a diversidade de métodos diretos e indiretos para tratamento tornaram-se possíveis. Por essa razão, a incidência e as taxas de mortalidade para o câncer cervical sofreram um drástico declínio durante o século XX, com aproximadamente 12.900 novos casos e 4.400 mortes estimadas para o ano de 2001 (44).

Em todo o mundo, a incidência e a mortalidade do câncer cervical apenas são superadas pelos índices do câncer de mama, ocupando o sétimo lugar em mortalidade na população total e o segundo entre mulheres; nos países em desenvolvimento, o câncer cervical é a maior causa de mortes em mulheres com idade reprodutiva (44, 45).

Segundo Baseman JG (2005), a prevalência de infecção por HPV é maior em mulheres mais jovens quando comparada a mulheres com idade mais avançada (12).

O câncer cervical, em 95% dos casos relatados, é causado por um vírus conhecido como Papilomavírus Humano (HPV). Este microorganismo é considerado um importante fator para a compreensão da história natural do câncer cervical e sua relação com o sistema imune.

O HPV é conhecido, há muito tempo, como causador de tumores, tanto benignos (verrugas cutâneas e mucosas, papilomas), quanto malignos, como os carcinomas cutâneos e os que afetam mucosas, principalmente nas regiões anogenitais e do trato aéreo-digestivo superior (46).

Observa-se, porém, que os tipos mais comumente associados aos tumores benignos são diferentes daqueles encontrados nas lesões malignas (carcinomas). Dentre os carcinomas malignos, o mais importante, sem dúvida, é o câncer cervical, pois é o que mais atinge mulheres em todo o mundo. Cerca de 470 mil novos casos são diagnosticados por ano, sendo que na maioria destes, os HPV de alto risco -16 e -18 estão presentes (47).

Diversos fatores sócio-culturais são apontados como estando relacionados ao desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical. Entre estes se destacam a co-infecção por *Chlamydia trachomatis*, comportamento sexual, idade precoce da primeira relação sexual, maior número de parceiros sexuais, alta paridade, fumo, baixa situação sócio-econômica, higiene precária e ingestão prolongada de contraceptivos orais (43).

O fator de risco mais consistente para a infecção por HPV é o elevado número de parceiros sexuais. Vários estudos realizados em mulheres têm demonstrado fortes associações entre a aquisição de HPV genital e o número de parceiros sexuais durante a vida (48, 49, 50). Um curto espaço de tempo entre conhecer um parceiro e iniciar atividade sexual também aumenta o risco de infecção por HPV em mulheres (51).

A exposição ao fumo, mesmo sendo passiva, tem sido sugerida como fator relacionado a um aumento no risco de câncer cervical (52). A presença de substâncias carcinogênicas provenientes do cigarro na mucosa cervical tem sido descrita como uma possível explicação para esta associação epidemiológica. Outros fatores, restritos ao hospedeiro, tais como regulação hormonal, resposta imune e predisposição genética também têm sido relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical (53, 54).

Outro fator de risco relacionado à infecção por HPV é a presença do vírus do Herpes tipo 2, que ocorre no trato genital. Um estudo realizado por Yang Yu-Yen (2004) sugere que o vírus do Herpes esteja envolvido na carcinogênese cervical (55).

Com relação ao uso de contraceptivos orais, é difícil de avaliar a sua associação com a infecção por HPV. Um recente estudo demonstrou que o uso de contraceptivos orais apresentou uma associação com os subtipos de HPV de alto risco -16, -18 e -31, após ter sido ajustado para variáveis como idade e número de parceiros sexuais (50).

1.4. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e são classificados de acordo com seu potencial oncogênico e pela variabilidade na seqüência do gene L1 (2,0% a 10,0%). O HPV é considerado como de baixo risco (subtipos -6, -11, -26, -42, -43, -44, -54, -70, -73) ou alto risco (subtipos -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, -68) (56). Atualmente, são conhecidos mais de 230 subtipos diferentes que atingem a população e que afetam também outros vertebrados, como por exemplo, cães, coelhos, papagaios, ruminantes e baleias (44). O HPV pode ser classificado em tipos cutâneos ou mucosos, sendo que entre os tipos cutâneos destacam-se os HPV-5 e HPV-8, sendo considerados de alto risco, pois estes

estão intimamente relacionados com a epidermodisplasia verruciforme (EV), uma rara situação em que a pele sofre alterações ulcerosas e oportuniza a infecção por HPV, podendo ocasionar oncogênese humana (44).

Em geral, o HPV de baixo risco está relacionado com tumores benignos e lesões cutâneas leves, enquanto que, o HPV de alto risco está diretamente associado com NICs que podem progredir para carcinomas anogenitais (57). A vasta diversidade de câncer cervical está associada à infecção com os subtipos de alto risco de HPV. O HPV-16 é o mais prevalente subtipo mucoso de alto risco, seguido pelo HPV-18, HPV-31, entre outros. Aproximadamente 20,0% dos cânceres orais, particularmente carcinomas orofaríngeos em pacientes que utilizam tabaco e álcool em excesso, apresentam subtipos de HPV de alto risco (58).

Outras lesões malignas do trato anogenital também estão freqüentemente relacionadas às infecções por subtipos de alto risco de HPV, incluindo o câncer vulvar e o peniano, bem como o carcinoma anal, o qual ocorre mais freqüentemente em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (58).

1.5. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV

1.5.1. Organização Genômica do Vírus

A característica mais específica do HPV é que na maioria dos tumores benignos, o genoma viral é preservado como DNA episomal (não integrado ao genoma hospedeiro).

O vírus tem aproximadamente 55 nm de diâmetro e possui um capsídeo icosaédrico de 72 capsômeros que contém o DNA viral, de dupla fita e circular, com aproximadamente 8.000 pares de bases (pb), e compreende três regiões, conhecidas como região precoce (*early region*)

de aproximadamente 4 kb, região tardia (*late region*), com 3 kb e a região controladora (*Long Control Region*), com 1 kb (59, 60).

Somente uma das fitas do genoma circular do HPV é ativamente transcrita. O genoma possui oito regiões conhecidas como ORFS (*Open Reading Frames*), um complexo de proteínas funcionais codificadas pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, na região precoce, e que estão envolvidas no controle da replicação e transcrição virais durante o estado epissomal, e duas proteínas tardias que compõem o capsídeo viral (*L1* e *L2*) (60). A *LCR*, que possui a origem de replicação, situa-se entre *L1* e *E6*, em uma região de 500 a 1000 pb, representando cerca de 10,0% do genoma viral total (61) (Figura 1).

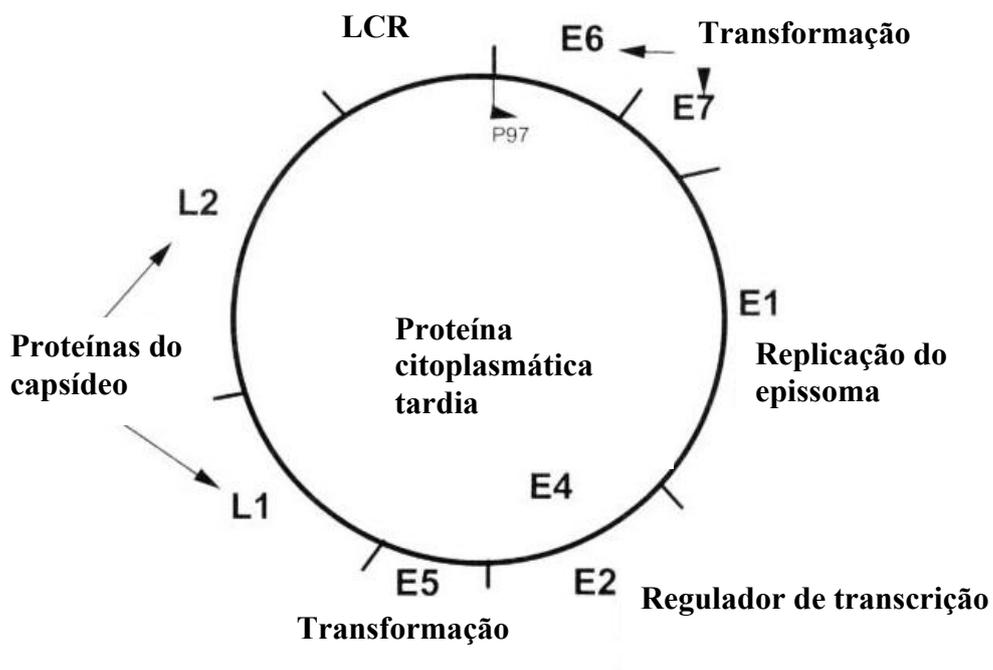


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR) (Howley PM *et al.*, 1996).

1.5.2. Expressão Gênica Viral e Câncer Cervical

Um dos eventos importantes da carcinogênese induzida pelo HPV é a integração do genoma viral em sítios cromossomais. Geralmente, esta integração ocorre frequentemente próxima a locais frágeis do genoma humano, mas não há evidências de locais específicos para esta integração (62, 63). As proteínas E1 e E2 dos papilomavírus desempenham importantes funções na replicação do genoma viral (59).

Estudos recentes mostraram que as proteínas virais E6 e E7, exercem funções importantes na oncogenicidade, ou seja, na formação de tumores (44, 59). A base molecular para a oncogênese do carcinoma cervical pode ser explicada devido a favoráveis condições de funcionalidade e regulação destas oncoproteínas. Estes dois genes têm demonstrado capacidade de transformação quando transfectados para células hospedeiras (44). Temos como exemplo, a oncoproteína E7 interagindo com pRB, uma proteína celular, produto do gene do retinoblastoma, que realiza uma importante função na regulação negativa do ciclo celular. Em consequência, a célula progride para a próxima etapa do ciclo celular, pois ocorre a liberação do fator de transcrição E2F que estava acoplado a pRB, passando a estimular a expressão de uma série de genes envolvidos na proliferação celular (64). Este processo é intensificado pela ação da proteína E6 dos HPV de alto risco, por sua ligação a p53, que termina com sua degradação (65).

A eliminação deste controle de proliferação e reparo do DNA celular (p53) provoca o acúmulo de mutações nas células que expressam tais oncoproteínas, resultando em um fenótipo alterado. Acredita-se, portanto, que o potencial oncogênico destes vírus seja, em parte, devido a essas interações. Isso é comprovado porque as mesmas proteínas E6 e E7 de HPV de baixo risco, não realizam estas interações (65).

Considerando-se que os HPV de alto risco podem causar instabilidade genética na célula hospedeira devido à integração no genoma celular, os acúmulos de mutações e aneuploidias, freqüentemente observadas em lesões neoplásicas de alto grau, também podem contribuir para que a proteína E6 atue sobre a ativação de telomerasas celulares, impedindo que as mesmas exerçam sua função no controle do envelhecimento e morte celulares, imortalizando as células infectadas por estes HPV (59, 66).

A maior parte das evidências de que o HPV é um agente etiológico do câncer humano envolve a sua detecção em tumores. Outras evidências que sustentam a idéia da oncogenicidade do HPV provêm de experimentos moleculares e celulares que mostram as capacidades de transformação do vírus. Os estudos iniciais sobre transformação demonstraram que a inserção de um genoma completo de HPV-16 induzia transformação maligna em fibroblastos de roedores. Da mesma forma, a transfecção de DNA de HPV-16 ou 18 em células epiteliais humanas do colo uterino e em queratinócitos de prepúcio neonatal, conferia imortalização às células, mas não sendo assim com o DNA de HPV-6 de baixo risco. O evento da transformação parece ser específico da célula hospedeira, assim como dependente do tipo de HPV (64). Diversos estudos têm mostrado que as ORFS de E6 e E7 são necessárias para a transformação de células humanas, mas apenas quando provenientes de HPV-16 e -18 (66).

Essas características únicas de transformação do genoma de HPV foram definidas em maior profundidade em nível molecular. O genoma viral normalmente está integrado aos cromossomos de células hospedeiras nas linhagens celulares do carcinoma no colo uterino, mas nas lesões benignas esse genoma encontra-se na forma de epissomas extra-cromossômicos. O local da integração viral comumente está na ORF de E2 ou próximo dela, a qual regula a manifestação de E6 e E7. Com a perda da regulação, E6 e E7 podem fornecer às células um fenótipo maligno (66). O HPV já mostrou também ter como alvo genes humanos

supressores de tumores. A proteína E6 dos HPV-16 e 18, mas não a dos tipos HPV-6 ou -11, liga-se ao produto do gene p53 supressor de tumores e promove a sua degeneração. Acredita-se que a degeneração da proteína p53 resulte no bloqueio das respostas celulares aos danos sofridos pelo DNA, permitindo assim a acumulação de alterações genéticas e a criação de um genótipo maligno (67). Da mesma forma, o produto da proteína E7 do HPV combina-se com o produto do gene retinoblastoma (Rb) supressor de tumores e pode causar depressão ainda maior nas defesas celulares contra o desenvolvimento de malignidade.

1.5.3. Ciclo Fisiopatológico do HPV

O HPV é um organismo exclusivamente intracelular que infecta células mitoticamente ativas para se estabelecer no epitélio. Isto explica porque tanto carcinomas escamosos como glandulares se originam na junção escamocolunar e dentro da zona de transformação, pois nesse local há acesso imediato às células basais e parabasais do epitélio metaplásico (59). Após a exposição ao HPV, iniciam-se os eventos do ciclo viral, com a atividade específica coordenada por fatores que regulam a resposta imune do hospedeiro.

Quando o vírus infecta uma célula pode ocorrer infecção latente, na qual o DNA exposto reside no núcleo, a replicação viral fica adjunta ao ciclo celular, e as células infectadas têm aparência normal. Essa infecção latente pode converter-se em infecção ativa por mecanismos ainda desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que a imunodepressão fisiológica (gravidez) ou patológica (AIDS) pode levar à doença, ou à volta ao estágio inicial com a recuperação da imunidade. A infecção latente só pode ser detectada através de estudos moleculares (68).

O ciclo de vida do papilomavírus é dependente do programa de diferenciação do epitélio infectado. O vírus infecta inicialmente células epiteliais basais, as quais estão ativamente em divisão celular. O DNA viral é mantido em um número pequeno de cópias dentro dos núcleos das células infectadas até que estas sofram diferenciação e sejam movidas à superfície do epitélio. Ao final da diferenciação celular, o vírus replicou diversas vezes apresentando um número elevado de cópias e, também, os genes tardios são expressos (1, 68).

Os vírions do HPV infectam as células epidérmicas germinais na camada basal, e essas células não permitem a replicação do HPV. À medida que as células germinais se dividem e se deslocam para a superfície, elas disseminam o vírus a todas as células irmãs. Essas células se transformam e proliferam de forma displásica. Essa camada celular fica mais espessa e cada célula passa a ficar vacuolizada, tomando uma aparência clássica de verruga. Portanto, a aparência de uma verruga deve-se à proliferação celular, e não à destruição de células. As células infectadas passam por um processo de diferenciação e queratinização, permitindo a replicação viral (69). Os vírions infectantes são agrupados e liberados por essas células, podendo reinfectar as células adjacentes, e por essa razão as verrugas são contagiosas e aparecem agrupadas. Na medida em que o vírus amadurece e as partículas virais se agrupam, ele migra para células hospedeiras em direção à superfície; conseqüentemente, o vírus completo é encontrado apenas nas camadas epiteliais superiores. Se várias células basais diferentes, próximas umas das outras são infectadas, suas colônias em sobreposição adquirirão a aparência de uma verruga em forma de couve-flor. O tempo de incubação viral varia de acordo com o local da célula infectada. As verrugas nas mãos e nos pés apresentam um longo período de incubação (seis a dezoito meses); já as verrugas genitais apresentam um curto período de incubação (dois a seis meses) (69).

Esse gradiente de replicação e manifestação do epitélio basal para o epitélio superficial tem implicações significativas para a detecção e o tratamento das infecções por HPV. Além de conter genomas únicos, os diferentes genótipos de HPV demonstram variabilidade em termos dos locais epiteliais nos quais são encontrados e das lesões que induzem. Um método simples de classificação divide os HPV em grupos cutâneos (infecta a pele) e mucosos (infecta as mucosas urogenitais e bucorespiratórias) (59).

Existem vários estágios diferentes de interação célula-vírus. O primeiro é a fase de incubação, que dura de duas semanas a oito meses (média de três meses). Esse é o período no qual se estabelece a infecção epissômica, com a interação célula-vírus, sendo regulada por fatores como tabagismo, deficiência do sistema imune ou predisposição genética. O vírus, inicialmente age como um plasmídeo extra-cromossômico auto-replicante - epissoma. Estes, a cada divisão mitótica da célula hospedeira, também serão replicados (70).

A infecção epissômica pode ocorrer com a inoculação em locais de micro-traumas, permitindo que os vírions penetrem na camada basal e liberem o seu capsídeo protéico externo. Já a infecção viral pode permanecer sem manifestação ativa da doença nas células basais provavelmente na maior parte das pessoas expostas ao HPV. A doença ativamente revelada resultará numa expressão morfológica em células escamosas diferenciadas. Quando isto ocorre, há uma fase de proliferação ativa que dura de três a seis meses. Durante esta fase, a estimulação das células hospedeiras leva à alteração pronunciada no crescimento da camada basal, replicação viral nas camadas médias e efeitos citopáticos virais nas células superficiais (71, 72, 73) (Figura 2).

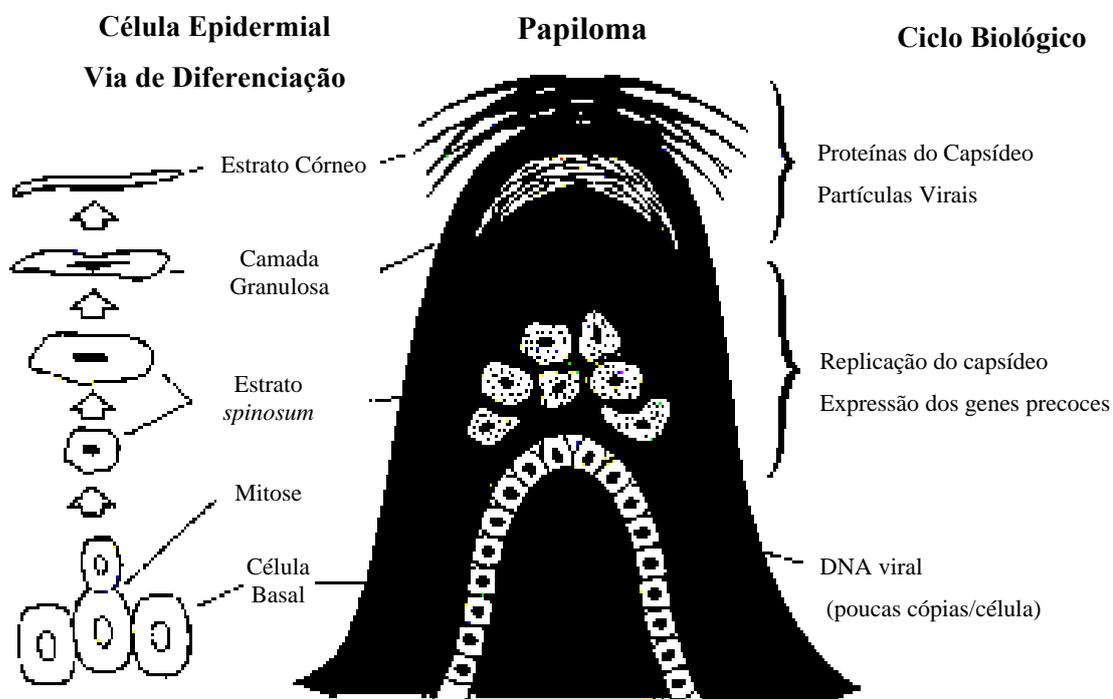


Figura 2. Fase de proliferação de células infectadas por HPV e formação do papiloma (Bosch FX *et al.*, 1995)

Estas alterações podem se manifestar como doença óbvia ou campos subclínicos de acetobranqueamento que contém graus variados de neoplasia ou formação de papilomas macroscopicamente aparentes. A expressão ativa em longo prazo da doença (como por exemplo, de condilomas ou de neoplasias) após a exposição ao HPV é exceção, e não é tida como regra (74).

Após a resposta imune à infecção por HPV, inicia-se a fase tardia, com duração de três a seis meses; nesta fase, pelo menos 80,0% das mulheres infectadas permanecerão em estado de remissão clínica, mas poderão apresentar infecção persistente ou latente por HPV. A maioria das lesões tende a regredir espontaneamente pela resposta do sistema imunológico do hospedeiro, porém, não é possível prever nos casos de infecção por vírus de alto risco, para qual estado a infecção progredirá (64).

Uma verruga ou tumor benigno é a manifestação patológica da infecção por HPV. Essas manifestações às vezes progridem para uma condição maligna, portanto, o HPV é um bom modelo para o estudo da progressão de tumores (67).

1.6. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydiae são bactérias patogênicas intracelulares, com parede celular semelhante a das bactérias gram-negativas, não-móveis e parasitas, amplamente distribuídas no Reino Animal (75).

Historicamente, todas as clamídias foram classificadas em uma única ordem, as *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, dentro de um único gênero *Chlamydia* e quatro espécies conhecidas: *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*. Todas as espécies, exceto *Chlamydia pecorum* estão associados a doenças em humanos (6).

As *Chlamydiae* sobrevivem replicando-se unicamente dentro de um vacúolo especializado de células eucarióticas denominadas de inclusões citoplasmáticas. As *Chlamydiae* possuem restrições metabólicas e são incapazes de sintetizar ATP, necessitando, desse modo, de fonte externa de energia. A replicação apresenta um ciclo multimórfico e sem sincronismo (76).

Por apresentar ciclo biológico intracelular obrigatório, o gênero *Chlamydia* foi considerado inicialmente um vírus (76). Diferente dos vírus possui RNA, DNA e ribossomo típico de organismos procariotos. Por outro lado, apresenta duas unidades gênicas controladas por seqüências regulatórias comuns (operons), o que torna a *Chlamydia trachomatis* diferente dos demais procariotos. Elas exibem similaridades morfológicas e estruturais a uma bactéria

gram-negativa, incluindo uma membrana trilaminar que contém lipossacarídeos e diversas proteínas de membranas que são estruturalmente e funcionalmente análogas a estrutura de *Escherichia coli* (77, 78, 79). O ciclo de desenvolvimento das clamídias é único e as diferencia de todos os outros microorganismos (77).

A espécie *Chlamydia trachomatis* está dividida em 15 sorotipos agrupados em 3 biotipos com base em diferenças biológicas (Quadro 1).

Sorotipos	Sexo	Síndrome
A, B, Ba, C	Ambos	Tracoma, conjuntivite
D, E, F, G, H, I, J, K	Mulher	Uretrite, cervicite, endometrite, salpingite, doença inflamatória pélvica.
	Homem	Uretrite, prostatite, epididimite.
	Ambos e recém-nascidos	Conjuntivite, proctite, síndrome de Reiter, pneumonia.
L1, L2, L3	Ambos	Linfogranuloma venéreo

Quadro 1. A relação entre os sorotipos, o sexo acometido e as doenças causadas por *Chlamydia trachomatis*.

A infecção por *Chlamydia trachomatis* é a doença sexualmente transmissível bacteriana mais comum (40, 42).

Os sorotipos A, B, Ba e C são associados com o tracoma endêmico, que já foi a causa mais comum de cegueira, cuja prevenção é possível. Já os sorotipos L1, L2 e L3 estão associados ao linfogranuloma venéreo. Os sorotipos D à K são os responsáveis pela uretrite não gonocócica e epididimite em homens e podem induzir a Síndrome de Reiter, proctite e conjuntivite tanto em mulheres quanto em homens. Em mulheres, estes sorotipos causam cervicite, uretrite, endometrite, salpingite e peri-hepatite (35).

O genoma da *Chlamydia trachomatis* é formado por um cromossomo circular, com 1.042.519bp (58,7% de A-T) e um plasmídio com 7493pb (número de acesso no Gen Bank

AE001273). O genoma é extremamente pequeno e completo e contém RNA ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S (80).

O genoma da clamídia codifica para aproximadamente 875 proteínas, das quais setenta são exclusivas da espécie *Chlamydia trachomatis*. Até o momento foram seqüenciados os genomas dos sorotipos D, B e L2 de *Chlamydia trachomatis* (79).

O plasmídio críptico de *Chlamydia trachomatis* sorotipo D apresenta 8 ORFs (fases de leitura aberta) intercaladas por quatro seqüências curtas não codificantes de 22pb em *tandem*. Os genomas das espécies de clamídias apresentam baixa homologia entre si e seus plasmídios podem ser distinguidos por *Southern Blotting* e por mapeamento com enzimas de restrição. Todos os plasmídios de isolados de *Chlamydia trachomatis*, por sua vez, são extremamente conservados, com menos de 1,0% de variação na seqüência nucleotídica (80).

Isolados clínicos de *Chlamydia trachomatis* que não apresentam plasmídio, embora raros, já foram caracterizados (81, 82). Observou-se que o padrão de susceptibilidade a antibióticos por linhagens de *Chlamydia trachomatis* com e sem plasmídio não difere, o que demonstra que este não contribui na transferência de resistência. Por outro lado, linhagens de *Chlamydia trachomatis* que não apresentam plasmídio diferenciam-se das demais pela morfologia não usual das inclusões e pela ausência de glicogênio (82).

A *Chlamydia trachomatis* se apresenta de duas formas, uma infecciosa extracelular, o corpo elementar (EB) de 350nm de diâmetro, que entra no endossoma da célula hospedeira através de fagocitose, pinocitose ou endocitose mediada por receptores na superfície da célula epitelial suscetível à infecção; e uma forma replicativa metabólica não-infecciosa, o corpo reticular (RB), de 800 a 1000nm de diâmetro. O ciclo biológico é completado dentro do endossoma e se organiza na forma do corpo reticular (RB), maior em tamanho e mais rico em RNA (83). Após aproximadamente 8 horas, o corpo reticular começa a se dividir e em 18-24

horas, retorna à forma de corpo elementar, que é lançado para o meio extracelular, podendo iniciar um novo ciclo de infecção (35).

Chlamydia trachomatis tem sido estudada extensivamente devido a sua associação com tracoma ocular e sua importância como patógeno sexualmente transmissível. Tendo uma complexa antigenicidade, são poucos os antígenos importantes para o diagnóstico e patogênese da infecção: os antígenos lipossacarídeos (LPS), constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico e o antígeno da *major outer membrane protein* (MOMP), que são utilizados para a sorotipagem de espécie e subespécie (caracterização realizada através de painel de anticorpos monoclonais) (35).

1.7. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE HPV E *Chlamydia trachomatis*

A manifestação clínica associada ao HPV é o *condiloma acuminado* (excrecência papilar única ou múltipla) (57). Em princípio, a infecção por HPV pode ser classificada como *latente, subclínica e clínica*. Na forma latente é feito o diagnóstico através da hibridização do DNA em indivíduos com tecidos clínicos e colposcopicamente normais; portanto, esta forma refere-se aos casos em que, na ausência de evidências clínicas, colposcópicas, citológicas e histológicas de lesões, sejam identificadas seqüências de DNA de HPV com técnicas de hibridização molecular (84, 85).

Na forma subclínica, a infecção no colo uterino e nos genitais masculinos é a mais freqüente; esta infecção pode estar associada à neoplasia intra-epitelial e é diagnosticada com o uso do colposcópico após aplicação de ácido acético a 5,0% (57).

Em uma manifestação clínica, as lesões são observadas sem maiores dificuldades. Os *condilomas acuminados* (papilomas, verrugas) dos órgãos genitais externos em geral são

pequenas neofomações sésseis, papilares, únicas ou múltiplas, localizadas ou difusas e de tamanho variável. No homem, em geral ocorrem lesões na glândula, sulco bálano-prepucial e região perianal e, na mulher, vulva, períneo, região perianal, vagina e colo (57).

Com relação à infecção por *Chlamydia trachomatis*, o maior impacto da infecção se dá no aparelho reprodutor feminino (42). Embora a maior parte das infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* em mulheres sejam assintomáticas, pode ocorrer manifestações como cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP) e abscessos na glândula de Bartholin. Quando sintomática, observa-se corrimento vaginal, disúria e sangramento e dor após as relações sexuais (86, 87).

O sítio inicial da infecção é usualmente a endocérvix, mas pode ocorrer na uretra e no reto. Infecções somente na uretra são menos comuns, cerca de 5,0% a 30,0%; na endocérvix e uretra, 50,0% a 60,0% (43). A ascensão do microorganismo do trato geniturinário baixo para endométrio e trompas de Falópio pode ser a causa de dor no baixo ventre e anormalidades menstruais (88).

A DIP resulta de infecção ascendente e é responsável pela morbidade da infecção. O paradoxo em relação a esta infecção é que mesmo assintomática pode causar grave lesão tubária. A salpingite latente e não tratada é a maior causa de infertilidade. Diversos estudos associam a infecção tanto sintomática quanto assintomática à gravidez ectópica (42, 88, 89, 90, 91). Esta pode ocasionar a morte durante o primeiro trimestre de gravidez, sendo que em mulheres americanas, nos últimos vinte anos, esta enfermidade tem apresentado uma frequência maior (89).

Em gestantes, a infecção por *Chlamydia trachomatis* varia de 2,0 a 35,0% e esta aumenta em dez vezes o risco de parto precoce e morte neonatal. O diagnóstico da infecção na

gestante, bem como no parceiro sexual, evita problemas no final da gestação e doenças perinatais (35).

Em neonatos, a consequência mais comum é a conjuntivite de inclusão neonatal, que frequentemente é associada à pneumonia em bebês. A conjuntivite se desenvolve dentro de duas semanas após o nascimento e, quando não é tratada, pode ocasionar a pneumonia. O tratamento da pneumonia pode necessitar prolongada hospitalização, deixando como seqüela um risco de deficiência na função pulmonar e mesmo uma possível doença respiratória crônica (35).

Em homens, a infecção uretral é assintomática em 50,0%; quando sintomática, as manifestações ocorrem entre uma a três semanas após a exposição sendo indistinguível de uma infecção por gonorréia (secreção purulenta da uretra). No entanto, a uretrite sintomática, causada por *Chlamydia trachomatis*, é menos provável quando comparada à uretrite gonocócica. Entre as uretrites não-gonocócicas, a clamidial é responsável por 30,0% a 50,0% dos casos e, quando não tratada, pode levar a artrite ou Síndrome de Reiter. A epididimite ou infecção dos ductos espermáticos dos testículos é mais rara em jovens com idade menor de 35 anos sexualmente ativos, ao contrário do que pode ocorrer em faixas etárias maiores, nas quais está associada a outras doenças podendo provocar dor e inflamação escrotal, febre e sintomas uretrais (35).

Entre os homossexuais e bissexuais, a prevalência é um terço da relatada nos heterossexuais. Neste grupo o sítio mais freqüente de infecção é na mucosa retal, apresentando proctites e sintomas como tenesmo, diarréias e hemorragia (35).

O linfgranuloma venéreo (LGV) é uma doença sistêmica provocada pela *Chlamydia trachomatis* de sorovarietades L1 a L3. É altamente prevalente na África e América do Sul e ocorre tanto em homens como em mulheres. O sintoma primário é uma úlcera ou pápula

genital. Nos praticantes de intercuro anal, o sintoma mais freqüente é a proctocolite com um quadro clínico semelhante à doença inflamatória do intestino (35).

O tracoma é uma doença crônica da córnea e conjuntiva, causada por repetidas infecções por *Chlamydia trachomatis* de sorovariedade A, B, Ba (92). As regiões endêmicas de tracoma foram reduzidas às áreas de inadequado sanitarismo e higiene pessoal precária, deixando de ser a causa mais comum de cegueira em todo o mundo (92).

1.8. VIAS DE TRANSMISSÃO DE HPV E *Chlamydia trachomatis*

A transmissão do HPV pode ocorrer através de contato sexual, não-sexual e materno-fetal. Na maioria dos casos, a via sexual é a que representa maior risco, sendo a freqüência de 10,0% a 15,0% em pacientes sexualmente ativos de idade entre 18 a 28 anos (1). É importante lembrar que o sexo oral também pode levar à transmissão do vírus e ao conseqüente aparecimento de lesão. Existem estudos que indicam que a auto-inoculação ou transmissão através de objetos de uso diário também é possível (1, 93).

Na forma de transmissão não-sexual, lesões verrucosas comuns da pele podem ser transmitidas por inoculação no próprio indivíduo ou em outro, através de fomites (coçaduras, toalhas, roupas íntimas). Vale ressaltar que este vírus tem preferência pelas células dos epitélios escamosos, sendo que através de microlacerações o vírus é inoculado e invade células da camada basal. Embora não se saiba por quanto tempo o vírus resista fora do organismo, considera-se a que a infecção por fomites seja viável por um curto período de tempo, e que mulheres e crianças sem atividade sexual também são considerados alvos para o desenvolvimento da infecção (93).

Já a transmissão materno-fetal pode se dar através do canal do parto. Em geral, durante a gestação as mulheres se tornam imunologicamente deprimidas e podem desenvolver lesões graves, por vezes de difícil tratamento, que podem regredir após o parto. Neste caso, o parto normal é contra-indicado. A inoculação acidental também é possível, ou seja, a manipulação das crianças pela mãe ou outro indivíduo com lesões verrucosas pode levar ao aparecimento de tais lesões (93).

Com relação à *Chlamydia trachomatis*, os fatores de risco para adquirir a infecção são diversos, destacando-se mulheres com menos de 20 anos, separadas e sem filhos; uso de contraceptivos orais, raça negra, classe sócio-econômica desfavorecida e o comportamento de risco como a promiscuidade e o não uso de preservativos (42).

O impacto maior da infecção por clamídia ocorre no sistema reprodutivo feminino. Aproximadamente, 65,0% dos recém-nascidos de mães infectadas contraem a infecção quando o parto é natural. O tratamento de pacientes infectados previne a transmissão ao parceiro sexual e a transmissão da gestante ao bebê durante o trabalho de parto. *Chlamydia trachomatis* pode ser transmitida ao feto durante o parto vaginal, resultando em pneumonia neonatal. Infecções vaginais, faringiais e entéricas também já foram relatadas em neonatos (40, 86).

1.9. PREVENÇÃO E TRATAMENTO

O objetivo do tratamento para HPV é a remoção das lesões condilomatosas visíveis e subclínicas. As recidivas são freqüentes, mesmo com o tratamento adequado. Portanto, existem algumas maneiras de evitar a infecção pelo HPV, através do contato direto com o vírus. Métodos contraceptivos de barreira (preservativos femininos e masculinos) são

recomendados, limitar o número de parceiros sexuais, manter abstinência sexual durante o tratamento, encaminhamento a um serviço de saúde e possível tratamento do parceiro sexual caso haja suspeita de infecção (71).

Para o estabelecimento da melhor forma de tratamento, devem-se considerar alguns critérios, como melhor relação custo/benefício para cada situação, a verificação do tipo, do número e da topografia das lesões, bem como avaliação das características dos pacientes (idade e susceptibilidade às intervenções), e a associação com neoplasia intra-epitelial (71).

Atualmente, há diversos métodos disponíveis no mercado, como procedimentos citodestrutivos (excisão cirúrgica com bisturi, LASER, ácido salicílico, eletrocirurgia, crioterapia, ácido bicloro e tricloroacético, cantaridina e ácido nítrico fumegante), métodos antivirais e/ou imunomoduladores (interferon beta e gama, imiquimod, cidofovir, “antisense” oligonucleóides e dinitroclorobenzeno (DNCB)), quimioterapia (bleomicina, 5-fluorouracil, podofilina, podofilotoxina), e outros métodos (cimetidina e psicoterapia) (71).

Para a prevenção e tratamento de infecções por *Chlamydia trachomatis*, também são necessárias mudanças comportamentais, que reduzem o risco de adquirir a infecção bem como outras doenças sexualmente transmissíveis; e a identificação e tratamento de parceiros com a infecção genital antes que estes possam transmitir o agente patológico. Diversas mudanças comportamentais como o adiamento da primeira relação sexual, diminuição do número de parceiros sexuais e o uso de preservativos, são essenciais para evitar ou minimizar a infecção por *Chlamydia trachomatis*. O uso de microbicidas vaginais como esponjas vaginais contendo o espermicida monoxinol 9 também são indicadas para a prevenção da infecção. O monoxinol 9 apresenta uma atividade “*in vitro*” contra *Chlamydia trachomatis* e estudos demonstram a redução da transmissão entre mulheres e homens (94, 95).

Diversos antibióticos têm excelente atividade contra *Chlamydia trachomatis*, como por exemplo, tetraciclina, macrolídeos e fluoroquinolonas. Atualmente, o antibiótico azitromicina vêm apresentando melhores resultados, com chance de recorrência de 5,0% a 13,0% em adolescentes tratadas (96).

1.10. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV

Os HPV de alto risco têm sido encontrados em proporções muito elevadas em mulheres com câncer invasivo e lesões pré-invasivas de alto grau, através da utilização de técnicas moleculares (PCR e captura híbrida II) (97). Por outro lado, a prevalência é baixa em mulheres citologicamente normais, exceto em mulheres jovens, que parecem ter uma alta incidência de infecções transitórias nos anos subsequentes ao início da atividade sexual. Alguns estudos demonstram o importante papel na presença e persistência de tipos de HPV de alto risco na progressão de lesões pré-invasivas de baixo grau versus lesões de alto grau ao invés de regressão espontânea. Por essas razões, a tipagem do HPV tem sido sugerida como uma possível ferramenta de triagem primária (98).

Existem muitos métodos para detectar a infecção por HPV. Estes podem ser classificados em indiretos (colposcopia, citologia, histologia e sorologia) e diretos (microscopia eletrônica, detecção do DNA por hibridização - *Southern Blotting* e Captura Híbrida, e PCR (93)).

1.10.1. MÉTODOS INDIRETOS

1. Detecção Clínica

O método mais simples de detecção da infecção genital pelo HPV é a observação das verrugas genitais a olho nu. Entretanto, estima-se que apenas 5,0% dos pacientes com infecções genitais por HPV apresentam condilomas típicos. Outros 10,0% dos pacientes com HPV genital podem ser identificados através do uso de uma técnica que expõe lesões na área genital a uma solução de ácido acético a 5,0% durante 3 a 5 minutos com gaze. A aplicação do ácido acético resulta em uma tonalidade esbranquiçada, bem demarcada do tecido anormal. Essa técnica que pode ser realizada no consultório pode detectar lesões "invisíveis" que abrigam tipos oncogênicos de HPV (16, 99).

2. Exame Cito-Patológico (CP)

O exame cito-patológico, embora seja simples, exige um profissional treinado e cuidadoso (99). O encontro de alterações citológicas, mesmo pequenas, deve ser atentamente valorizado pelo clínico. Porém, em alguns casos, não há descrição de um quadro citológico definido; estes casos, geralmente, são enquadrados como ASCUS (atipia escamosa de significado indeterminado) ou AGUS (atipia glandular de significado indeterminado) (99). Estatísticas mundiais mostram que em média 10,0% das pacientes com alterações citológicas indeterminadas irão desenvolver lesões intra-epiteliais de alto grau. Portanto, é importante que estas pacientes sejam encaminhadas ao acompanhamento médico (clínico e colposcópico), com biópsia e possível curetagem do canal endocervical (16).

As células infectadas pelo HPV exibem alterações variadas, vistas em esfregaços e biópsias e são denominadas de coilócitos (células com região perinuclear límpida e citoplasma denso que foram descritas primeiramente por Papanicolaou em 1933 (71)). Além dessas alterações, as mudanças podem ser observadas na forma e no tamanho nuclear e na distribuição da cromatina (71).

Os coilócitos estão presentes nas infecções por HPV onde as partículas virais se encontram em processo de agrupamento, e normalmente encontra-se em lesões clinicamente aparentes. A imunohistoquímica pode detectar o revestimento protéico das partículas virais que se encontram nessas lesões. Ao contrário, as lesões de alto grau e os carcinomas invasivos carecem de coilócitos. O DNA-HPV pode estar presente nessas lesões, mas a atividade de transcriptase talvez não resulte na produção de vírions, que são detectáveis através de microscopia de luz ou imunohistoquímica (71).

3. Exame Colposcópico

Método de ampla aceitação mundial para o diagnóstico de pacientes com citologia anormal, a sua prática requer um treinamento adequado e uma análise constante de sua qualidade (100).

Hans Hinselmaan, ginecologista alemão, em 1925 desenvolveu uma nova técnica para o diagnóstico do câncer do colo de útero. Com um microscópio de baixo poder, visualizou a cérvix com um melhor aumento. A aplicação deste método se desenvolveu lentamente e durante muitos anos, a colposcopia e a citologia esfoliativa se consideraram competitivas no diagnóstico de lesões cervicais. Somente em algumas décadas, observou-se a importância do

conjunto destas duas técnicas, pois a citologia e a colposcopia são métodos complementares para o estudo das NICs (100).

Uma das muitas vantagens da colposcopia é diminuir o tratamento cirúrgico da cérvix. Porém, é importante ressaltar que entre 15,0% e 20,0% das citologias anormais, a colposcopia não é suficientemente capaz de estabelecer um diagnóstico preciso e, portanto, necessita da citologia (100).

4. Sorologia

Os progressos na área da biologia molecular têm possibilitado o desenvolvimento de métodos sorológicos mais eficientes. As técnicas de clonagem do HPV em *vaccinia* ou *baculovirus* possibilitaram a expressão de suas proteínas antigênicas nesses sistemas recombinantes, como, por exemplo, as proteínas do capsídeo L1 e L2. Deste modo, tornou-se possível a produção de capsídeos virais. A partir de então, anticorpos humanos tipo-específico foram desenvolvidos contra essas proteínas, também contra proteínas não estruturais (E4, E6 e E7), permitindo assim a detecção de tipos virais que não podiam ser preparados a partir de lesões clínicas, entre elas HPV dos tipos 16 e 18 (74, 93, 101).

A detecção da resposta imune do tipo humoral oferece as seguintes vantagens: a) testes sanguíneos são mais fáceis de serem realizados, além disso, são mais bem aceitos pelas mulheres que se submetem ao exame clínico para lesões do tipo NIC ou câncer cervical invasivo; b) pode-se estudar a história natural da infecção viral; casos de infecção infantil, por exemplo, levam à hipótese de infecção pelo HPV nos períodos pré e perinatal e; c) pode-se monitorar a recorrência de tumores através de anticorpos específicos contra proteínas carcinogênicas do HPV (93).

Apesar disso, as informações sobre infecção por HPV disponíveis em exames sorológicos são limitadas, já que as papilomavíroses não se propagam em sistemas experimentais de rotina para a produção de grandes quantidades de proteínas virais, necessárias aos ensaios sorológicos (93).

1.10.2. MÉTODOS DIRETOS

Nas últimas décadas, os métodos diagnósticos moleculares têm ampliado muito os conhecimentos sobre a infecção por HPV e a carcinogênese viral. O domínio das técnicas biológicas moleculares usadas na detecção do HPV é necessário para qualquer discussão sobre as lesões malignas associadas a esta infecção, já que cada técnica apresenta características únicas com impacto significativo na sensibilidade e especificidade da mesma. As diferenças de sensibilidade/especificidade, assim como as contaminações entre as várias metodologias de detecção, têm por vezes, dificultando a determinação da associação entre o HPV e os tipos de câncer humano (102).

O método ideal de detecção do HPV deve se basear na presença de DNA-HPV, já que o vírus não precisa estar intacto para induzir doença. A utilidade clínica desses métodos ainda precisa ser determinada, mas seu uso em pesquisas básicas é crucial (102).

1. Hibridização por Southern Blotting

Várias técnicas baseadas nas propriedades de hibridização dos ácidos nucleicos foram desenvolvidas visando a triagem e isolamento de seqüências específicas do DNA e RNA. A

maioria destas técnicas trabalha com uma réplica do DNA de interesse imobilizado num suporte sólido tal como uma membrana de náilon ou de nitrocelulose. Um destes métodos, desenvolvido na década de 70 por E.M.Southern, tornou-se conhecida como *Southern Blotting* (103).

Nesta técnica, o DNA é digerido com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em um gel de agarose. Os fragmentos de DNA dupla fita são visualizados por coloração com brometo de etídio, desnaturados *in situ* com hidróxido de sódio e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon por capilaridade, com o auxílio de uma solução de alta concentração salina (74). Tais condições permitem que o DNA seja retido no suporte sólido, no ponto de contato entre o gel e a membrana, criando, portanto, uma réplica do gel. O DNA é covalentemente ligado à membrana usando-se calor ou luz ultravioleta. Sondas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA marcados radioativamente) podem ser utilizadas para hibridizar com o DNA fixado na membrana e a posição na qual a ligação específica ocorre pode ser detectada por auto-radiografia da membrana. O padrão de hibridização pode ser comparado diretamente com a região no gel original que contém a seqüência de DNA de interesse (103).

A detecção molecular inicial de DNA de HPV foi efetuada através do uso de técnicas de hibridização de ácido nucleico. Esse foi o método original de primeira escolha para a detecção de DNA de HPV, sendo considerado o *padrão ouro*, devido o seu elevado grau de especificidade e sensibilidade. Esse método permite uma diferenciação precisa dos diferentes tipos de HPV (103).

Porém, o seu elevado custo e laboriosidade fazem que este método não seja utilizado na rotina.

2. Hibridização in situ (HIS)

A hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de **DNA** ou **RNA** a partir de "sondas" específicas. Sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar. Com esta técnica, é possível identificar DNA de HPV nas células. Entretanto, a sensibilidade do exame é menor com essa técnica porque o DNA viral está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula (104, 105).

Para permitir a visualização da reação entre as moléculas de DNA ou RNA em estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotiniladas (104).

A hibridização *in situ* é uma técnica mais sensível que a imunohistoquímica, porém inferior à reação em cadeia da polimerase (PCR). A HIS é utilizada principalmente para a detecção de vírus (ex. diversos tipos de HPV, vírus de Epstein-Barr, vírus da hepatite B e de outros agentes infecciosos em tecidos suspeitos de infecção, além de cromossomos e produtos da síntese celular). Pode ser realizada em material fixado em formol e incluído em parafina, bem como congelado ou em preparados citológicos (106).

3. Captura Híbrida

A Captura Híbrida é um teste sensível capaz de detectar diversos agentes infecciosos, como o HPV, o vírus da hepatite B, Citomegalovírus (CMV), *Herpes simplex* vírus, *Chlamydia trachomatis*, HIV e *Neisseria gonorrhoea* (gonorréia). O teste de captura híbrida II (Digene) detecta dezoito tipos mais comuns de vírus do HPV que infectam o trato anogenital,

determinando com exatidão a presença ou não de DNA de vírus dos grupos de baixo risco (-6, -11, -42, -43 e -44) ou de alto risco (-16, -18, -31, -33, 35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68). Esta reação de hibridização molecular utiliza sondas não radioativa com amplificação da detecção dos híbridos por quimiluminescência (107).

Estudos demonstram que a sensibilidade do exame de captura híbrida II (1.0 pg/ml DNA-HPV ou 0,1 cópias/célula) é muito superior à apresentada pela hibridização molecular *in situ* (300 cópias/célula) e é similar àquela de outros testes mais demorados, que utilizam radioisótopos ou que manipulam o DNA, como a PCR, além de ser superior ao seu antecessor, a captura híbrida I (108, 109, 110).

A utilização clínica do teste de captura híbrida II é controversa. Alguns autores defendem seu emprego como teste de triagem em mulheres com diagnóstico citopatológico de ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado - *atypical squamous cells of undetermined significance*) ou lesões intra-epiteliais de baixo grau do colo uterino (111).

O exame é realizado a partir de material coletado da área suspeita de infecção utilizando-se *kit* apropriado, fornecido pelo laboratório. O *kit* é composto de um escova e um tubo plástico contendo uma solução ácida que digere qualquer outra estrutura (células, proteínas, gorduras, etc.) que não seja DNA ou RNA e fragmenta a molécula de DNA em curtas seqüências de bases nitrogenadas para facilitar a hibridização (107, 110).

Este teste compreende diversas etapas: a) desnaturação do material para análise, liberando ambas as fitas do DNA; b) reação com sonda de RNA específica para o agente infeccioso pesquisado, formando híbridos RNA/DNA; c) captura desses híbridos por anticorpos monoclonais, com formação de complexos imobilizados na parede do tubo (microplaca) utilizado para o exame; d) adição de anticorpo anticomplexo anticorpo-RNA-

DNA conjugado à enzima fosfatase alcalina; e) detecção por quimiluminescência ultrasensível (107, 110).

Esse avanço tecnológico possibilitou desenvolver um teste de fácil realização, podendo o resultado ser conhecido em curto tempo (108).

4. PCR (Polymerase Chain Reaction)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida em 1985 e desde então vem causando um profundo impacto na biologia molecular, permitindo aos pesquisadores maior facilidade na busca de DNA de HPV. A PCR é uma reação enzimática que resulta na amplificação de material genético “in vitro” (112).

A reação consiste de uma etapa de aquecimento em temperaturas elevadas, provocando a desnaturação do DNA. Em seguida, ocorre uma etapa de resfriamento, levando ao pareamento específico de dois segmentos pequenos de DNA (*primers*) ao gene de interesse permitindo, desse modo, que uma enzima (DNA polimerase) sintetize novos fragmentos de DNA. Quantidades muito pequenas de DNA podem ser amplificadas de forma altamente sensível e específica através de incubação na presença de uma série de reagentes que serão submetidos a diferentes temperaturas, de forma repetitiva, até se obter o produto final amplificado (113).

Ao final de 25 a 40 ciclos repetidos são gerados bilhões de cópias do material genético em estudo. Este é um processo extremamente rápido, eficiente, e atualmente automatizado, podendo fornecer resultados em algumas horas. A visualização do material amplificado é feita por eletroforese em gel de agarose e a comparação com controles adequados e marcadores de tamanho permite sua identificação precisa (112, 113).

Para uma identificação precisa do HPV foram necessários diferentes estudos descrevendo uma variedade de *primers* e procedimentos de PCR, cada um desses variando em sensibilidade e especificidade (74). Para a detecção de um ou poucos tipos de HPV, os métodos se tornam mais sensíveis quando a amplificação é realizada com *primers* específicos. Essa estratégia também é utilizada, em uma segunda amplificação por PCR, para a confirmação de resultados de amplificações com *primers consensus* ou genéricos. A amplificação com *primers consensus* permite detectar um amplo espectro de genótipos de HPV, bem como identificar novos tipos virais (93). Diferentes conjuntos de *primers consensus* foram desenhados e construídos para este propósito; entre eles: MY09/MY11, OBI/II, CPI/CPII e GP5+/6+ (113). Os *primers* MY09/MY11 e GP5+/6+ amplificam fragmentos de DNA correspondentes à sequência da ORF de L1 do genoma do HPV, conservada entre os diferentes genótipos, sendo que os produtos de amplificação obtidos com os *primers* MY09/MY11, são correspondentes a fragmentos de 450 pb (74, 113, 114).

Atualmente, a detecção molecular do HPV é principalmente utilizada em pesquisa laboratorial e não faz parte do processo de decisão clínico. Entretanto, à medida que os resultados se tornem mais aceitos, as técnicas moleculares serão de grande importância no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas com o HPV (74, 114).

Além da sua maior simplicidade em comparação ao *Southern Blotting*, a PCR tem o benefício de uma maior sensibilidade na detecção do HPV com quase a mesma especificidade (74). Devido a sua simplicidade, custo e sensibilidade, a PCR é atualmente o método preferido para a detecção de HPV (Quadro 2). Estas reações requerem quantidades muito pequenas de DNA e preparações relativamente impuras podem ser utilizadas. Uma outra vantagem deste método é que pode ser efetuado em tecido fixado e conservado em parafina permitindo

análises retrospectivas. Por ser um método muito sensível, é preciso controlar as condições de ensaio para eliminar os resultados falso-positivos devidos à contaminação (113).

O diagnóstico de HPV por PCR representa um complemento importante aos diagnósticos cito-histopatológicos e colposcópicos, não apenas de lesões pré-neoplásicas, mas também das infecções subclínicas associadas a esses agentes virais, tanto na mulher, quanto no homem (113).

Técnica Utilizada	Tecido	Dificuldade	Sensibilidade	Especificidade HPV
Exame clínico	Nenhum	Muito simples	Muito pouca	Nenhuma
Exame histológico	Fresco ou parafina	Baixa	Pouca	Nenhuma
Imuno-histoquímica	Fresco ou parafina	Baixa	Pouca	Pouca
Hibridização por <i>Southern</i>	Somente fresco	Muito alta	Alta	Muito alta
Hibridização por <i>Dot Blot</i>	Somente fresco	Baixa	Moderada	Moderada
Hibridização <i>in situ</i>	Fresco ou parafina	Moderada	Moderada	Moderada
PCR	Fresco ou parafina	Moderada	Muito alta	Muito alta

Quadro 2. Comparação entre as técnicas de diagnóstico para HPV.

5. Exame ImunoHistoquímico (IH)

O exame imunohistoquímico detecta o revestimento protéico das partículas virais do HPV, sendo utilizados anticorpos policlonais contra antígenos específicos aos vários tipos de HPV. Apresenta alta especificidade, porém detecta somente os vírus na sua forma episomal, predominante nas lesões de baixo grau. A sensibilidade é menor quando há integração do genoma viral ao da célula hospedeira, como nos casos de lesões intraepiteliais de alto grau, carcinomas epidermóides invasores e adenocarcinomas (115).

Comercialmente estão disponíveis anticorpos policlonais para vários tipos de HPV (*pool* ou anticorpos de amplo espectro) e anticorpos específicos que discriminam os tipos -6, -11 e -18 e apenas o tipo -18, isoladamente (116). Devido à sua baixa sensibilidade, a imunohistoquímica não é o método de escolha para diagnóstico de infecção pelo HPV.

1.11. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Chlamydia trachomatis*

A detecção da infecção por *Chlamydia trachomatis* ainda é um desafio, pois a frequência de infecções assintomáticas é muito frequente. Mesmo os casos sintomáticos podem não ser reconhecidos e confirmados exclusivamente por critérios clínicos devido à semelhança dos sintomas com outras doenças sexualmente transmissíveis (117).

A clamídia pode ser detectada através de pesquisa direta de antígenos, determinação de anticorpos e pesquisa de ácidos nucleicos (117).

Os testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção urogenital causada por *Chlamydia trachomatis*, tradicionalmente, empregam swabs endocervicais ou uretrais para a obtenção da amostra. Os testes de detecção de ácidos nucleicos têm adquirido importância por utilizar também amostras de urina, especialmente quando se quer identificar pessoas assintomáticas (117).

Em qualquer método que se utilize, a coleta adequada é essencial, e se relaciona diretamente à sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico (117).

1. Cultivo Celular

Durante muitos anos, a cultura bacteriológica foi considerada “padrão ouro” no diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Porém, o advento das técnicas moleculares e as limitações como a labilidade de *Chlamydia trachomatis* nas amostras clínicas e variações de performance interlaboratorial do cultivo, levaram a repensar esta condição (42).

A cultura é realizada pela inoculação de cada linhagem celular (células McCoy, BGMK e HeLa 299) distribuídas em monocamada sobre microplacas e um meio que favorece o crescimento das células. Para verificar a positividade do teste, ou a presença de inclusão intracitoplasmática, cora-se o tecido cultivado preferencialmente com anticorpo monoclonal fluorescente. Também podem ser utilizado iodo, azul de toluidina ou Giemsa, porém com menor eficiência (42).

A vantagem da cultura é que esta técnica possui um potencial mínimo de contaminação e preserva o microorganismo para estudos adicionais, como teste de suscetibilidade à terapia antimicrobiana e genotipagem (42). Para fins médico-legais e em suspeita de estupro e abuso sexual, a cultura é o teste mais recomendado. Entre as desvantagens da cultura está a falta de padronização entre os laboratórios e a necessidade de microorganismos viáveis; por isso, embora a especificidade seja 100,0%, a sensibilidade, mesmo em laboratórios de excelência, é de 80,0% (42).

A cultura de células foi a técnica de referência (padrão ouro), mas não era a ideal (42), podendo subestimar a especificidade de outras técnicas mais sensíveis. Resultados discordantes em relação ao teste cultural eram considerados como falsos positivos, quando na verdade faltava sensibilidade à cultura (117).

O *Food and Drug Administration* (FDA) tem ampliado a definição de um resultado verdadeiramente positivo para a infecção por clamídia, baseando-se na combinação de dois testes, o cultural e não cultural (42).

A utilização da técnica padrão ouro define melhor o real desempenho e a utilidade clínica de métodos não culturais. De acordo com o guia da prática clínica, publicado pelo CDC, um diagnóstico é definitivo quando a cultura para clamídia é positiva ou um teste não cultural é confirmado por um segundo teste não cultural (118).

2. Pesquisa Direta de Antígenos

A visualização direta do antígeno da clamídia pode ser realizada utilizando corante a base de iodo, Giemsa e imunofluorescência direta (IFD).

A IFD é o único teste que avalia simultaneamente a adequação da amostra (pelo menos uma célula colunar epitelial) e a presença dos antígenos MOMP e LPS, utilizando anticorpos monoclonais fluorescentes. Apresenta uma sensibilidade que varia entre 80,0% a 90,0%, e uma especificidade de 98,0% a 99,0% em relação à cultura quando ambas são realizadas em condições ótimas (42).

A desvantagem do método é a necessidade de pessoal treinado adequadamente para preparar e interpretar os resultados. Quando o laboratório recebe uma grande quantidade de amostras, a IFD deixa de ser o método de escolha (42).

A detecção direta de antígeno pode ser realizada por teste de enzima-imunoensaio (EIE), os quais se apresentam de formas variadas quanto ao tipo de fase sólida (microplacas, pérolas, tubos), no qual se liga o anticorpo; o teste pode ser manual ou automatizado; a enzima pode

produzir cor ao reagir com seu substrato ou emitir fluorescência, entre outras formas de sinalizar o produto final (42).

Os EIes empregam anticorpos policlonais ou monoclonais para detectar o antígeno LPS da clamídia e esta é a maior desvantagem dos EIes, pela possibilidade de reação cruzada de LPS de outras bactérias (88). Os EIes têm uma sensibilidade menor que a cultura; existem EIes que utilizam anticorpo bloqueador para retestar amostras positivas, melhorando a especificidade (99,5%) do teste (87, 88).

A possibilidade de utilizar EIE por automação é uma vantagem a considerar para laboratórios que realizam grande número de exames (87, 88).

3. Pesquisa de Anticorpos Específicos

A imunidade desenvolvida após uma infecção por *Chlamydia trachomatis* é provavelmente tipo-específica e apenas parcialmente protetora, isto é, infecções recorrentes são comuns (42).

Os testes, em geral, detectam anticorpos gêneros-específicos, ou seja, contra o antígeno LPS presentes nos corpos elementares ou reticulares (76).

O título de anticorpos da classe de imunoglobulinas IgG determinado em uma única amostra não discrimina infecção prévia ou em vigência, além da possibilidade de reações cruzadas com outras espécies de clamídia, especialmente *Chlamydia pneumoniae*. A prevalência de ACs contra *Chlamydia pneumoniae* na população nos Estados Unidos é de 50,0% a 70,0% (119). Quando a prevalência de anticorpos na população é alta, o diagnóstico sorológico de infecção recente é difícil (76).

A pesquisa de anticorpos IgM como marcador de infecção aguda é pouco confiável, e freqüentemente não é detectado quando a infecção é recorrente (15 ou mais sorotipos e outras espécies) (76).

Os testes sorológicos são de pouco valor, exceto em duas situações: no diagnóstico de pneumonite clamidial em recém-nascidos e no linfogranuloma venéreo (120).

Testes de microimunofluorescência (MIF) para a pesquisa de anticorpos são utilizados como ferramenta epidemiológica em laboratórios de pesquisa. Os antígenos, representativos de todos os sorotipos de *Chlamydia trachomatis* (agrupados por afinidade) são colocados sobre a lâmina em quantidades mínimas (*dot*). O MIF é muito laborioso, dispendioso e limitado a poucos laboratórios de referência (120).

1.11.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydia trachomatis*

Devido à alta prevalência da infecção clamidial, o mercado crescente e a falta dos métodos tradicionais de diagnóstico deste agente etiológico, diversos testes comerciais, que envolvem a detecção de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidos (42).

A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por clamídia, por ser mais rápido e sensível, além de não depender da viabilidade da amostra (42).

Os métodos de detecção de ácidos nucleicos têm por alvo seqüências gênicas da MOMP, do plasmídio críptico ou do rRNA de *Chlamydia trachomatis*. Testes que utilizam genes em múltiplas cópias apresentam sensibilidade elevada, como é o caso do rRNA e do plasmídio críptico de *Chlamydia trachomatis*, o qual está presente na ordem de 7 a 10 cópias por EB (42).

1. Hibridização de Ácidos Nucléicos

As sondas de DNA vêm sendo utilizadas há mais de 10 anos. O teste de hibridização utiliza uma sonda de DNA marcado com éster de acridina complementar à seqüência de RNA ribossomal 16S do genoma da clamídia. O produto híbrido formado a partir de uma amostra positiva é absorvido por magnetismo e a quimiluminescência quantificada por um luminômetro. As amostras com mais de 6,0% de sangue são inadequadas, devido ao efeito de autofluorescência, podendo produzir resultados falso-positivos (83).

A sensibilidade é próxima à da cultura com a vantagem de permitir a detecção simultânea de *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (84).

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

A tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos foi o mais importante avanço no diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* desde que a técnica de cultura de células (*in vitro*) substituiu a técnica de isolamento a partir de amostras clínicas (121).

As técnicas de amplificação favorecem a detecção de pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas com rapidez. A amplificação de DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma seqüência de DNA alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica (121). Esta permite a identificação de indivíduos infectados assintomáticos através de coleta não invasiva (urina). A detecção do microorganismo é importante no tratamento do parceiro sexual e proporciona um guia para o monitoramento de pacientes que não respondem à terapia (121).

Os testes de amplificação de DNA para o diagnóstico da infecção por clamídia têm sensibilidade em torno de 20,0% maior que os testes mais utilizados nos laboratórios de patologia clínica (imunofluorescência direta e enzima-imunoensaio), demonstrando que a prevalência da infecção é maior do que o suposto (121).

Existem três testes de amplificação de DNA comerciais aprovados pelo FDA: a reação em cadeia da polimerase (PCR - Roche), reação em cadeia da ligase (LCR - Abbott) e a reação de amplificação mediada pela transcrição (TMA - Gen Probe). O PCR e a LCR amplificam uma seqüência de nucleotídeos do plasmídeo de *Chlamydia trachomatis*, que está presente em múltiplas cópias em cada EB do microorganismo. O TMA é dirigido ao rRNA, também presente em múltiplas cópias. Teoricamente, os três testes são capazes de detectar menos de 1 EB, mas em amostras clínicas existem problemas de inibição e de coleta que influenciam os resultados (122).

O índice de especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR dependem do tipo de *primer*, da técnica de referência a ser utilizada, do tipo de material, do método de detecção do produto amplificado, do método de preparação da amostra para o PCR considerando a presença de inibidores e ocorrência de contaminação (122, 123).

Muitos trabalhos confirmam a PCR plasmidial como a mais sensível pela possibilidade de detectar de sete a dez cópias de DNA, enquanto a PCR dirigida ao genoma codificador da maior proteína externa da *Chlamydia trachomatis* (MOMP) detecta somente uma cópia de DNA. Foi descrita a possibilidade da PCR plasmidial não detectar amostras clínicas infectadas e que perderam o plasmídeo, embora a comparação PCR-plasmídeo/PCR-MOMP não tenha revelado qualquer linhagem adicional sem plasmídeo. A PCR-MOMP não é disponível comercialmente, mas tem sido utilizada para analisar amostras com resultados discrepantes (122, 123).

Para avaliar a especificidade dos *primers* utilizam-se suspensões de cultura de linhagens de *Chlamydia trachomatis*, de *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, sendo que o PCR positivo apenas para as linhagens de *Chlamydia trachomatis* demonstra que os *primers* são específicos (123).

A sensibilidade dos vários métodos de detecção de *Chlamydia trachomatis* pode ser determinada por diluições seriadas das suspensões de cultura de células em monocamada, infectadas com as sorovariedades mais frequentes e a verificação da quantidade mínima de células que ainda produz DNA amplificado estudaram a sensibilidade do PCR plasmidial a partir de diluições com a sorovariedade G. O PCR plasmidial (*primers* CTP1 e CTP2) foi capaz de detectar 0,1 unidade formadora de inclusão em gel, e 0,01 a 0,1 quando usado a técnica de hibridização por *Southern Blotting*. É possível aumentar a sensibilidade utilizando-se a técnica de *Nested-PCR*. Este tipo de PCR pode ser um teste confirmatório do PCR plasmidial (123).

Outro emprego da reação de PCR é a genotipagem, que é considerada menos trabalhosa que a sorotipagem. A sorotipagem é realizada a partir de cultura seguida de aplicação de um grande painel de anticorpos monoclonais. Este método indica a variação antigênica e o alto nível de polimorfismo entre linhagens protótipos. A genotipagem baseia-se no PCR *omp I*, embora seja menos sensível, um procedimento adicional de hibridização pode aumentar a sensibilidade em amostras fracamente positivas (123).

O grande sucesso obtido inicialmente pela tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos foi refreado (a aprovação de kit comercial para *Chlamydia trachomatis* só ocorreu oito anos após) pela possibilidade de resultados falso-positivos devido à contaminação. A experiência, no entanto, provou ser mais preocupante os falso-negativos que os falso-positivos. Boas práticas laboratoriais e procedimentos de desinfecção de rotina previnem a

contaminação; já os inibidores na amostra são difíceis de serem identificados porque são imprevisíveis e detectados somente se controles de amplificação forem introduzidos (por exemplo, *primers* de β -globina humana). Outros recursos, como repetição da PCR em amostras diluídas, reação em duplicata contaminando propositalmente uma das amostras, não são adequados para introduzir na rotina clínica. A resolução destes problemas ainda é de grande interesse e merece melhor avaliação (123).

3. Captura Híbrida (HC)

O teste de Captura Híbrida (Digene) é um ensaio baseado em sonda de RNA e na amplificação do sinal de detecção. A sonda de RNA é homóloga à sequência completa do plasmídeo críptico de *Chlamydia trachomatis* (7.500pb) e a aproximadamente 39.000pb do genoma de *Chlamydia trachomatis* (124).

O híbrido DNA-RNA é capturado por anticorpos específicos conjugados a fosfatase alcalina e a geração do sinal ocorre pela clivagem de um substrato quimioluminescente pela enzima. A amplificação substancial do sinal é atingida porque várias moléculas de fosfatase alcalina são conjugadas a cada anticorpo e estes se ligam, por sua vez, em grande número ao híbrido DNA-RNA. O limite de detecção do teste de Captura Híbrida para *Chlamydia trachomatis* (HC II CT-ID) varia de 50 a 2500 EBs para os 15 sorotipos (124).

O teste apresenta-se em três diferentes formatos: HC II CT/NG que é o teste de triagem e não diferencia *Neisseria Gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*; HC CT-ID que é o teste específico para *Chlamydia trachomatis*, e HC GN-ID que é o teste específico para *Neisseria Gonorrhoeae*. Já existe no mercado a segunda geração deste protocolo, que emprega um

sistema semi-automatizado, porém apenas a apresentação manual têm aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (125).

A sensibilidade do teste de Captura Híbrida para *Chlamydia trachomatis* varia de 95,4 a 97,2% frente à cultura e PCR (Amplisor CT-PCR, Roche) e a especificidade é superior a 99,0% em amostras endocervicais (124). Assim, o método de detecção de ácidos nucleicos baseado em amplificação de sinal apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis aos métodos de amplificação de ácidos nucleicos em amostras endocervicais (124). Este método apresenta como vantagens dispensar a separação de áreas de trabalho e a simplificação dos equipamentos utilizados. A partir de único *swab* é possível realizar a pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e HPV (124, 125).

OBJETIVOS

Conhecer a prevalência de infecção genital por Papilomavírus Humano (HPV) e por *Chlamydia trachomatis* (CT) em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre.

Objetivos Específicos

Identificar os fatores estudados (cor, ocupação, parceiros sexuais, uso de anticoncepcionais, idade, entre outros) com estas infecções e verificar a associação destas com lesões cervicais.

Os objetivos acima descritos pretendem auxiliar na resposta às seguintes questões:

- Qual a prevalência de infecção genital por HPV e *Chlamydia trachomatis* em mulheres assintomáticas do nosso meio e como esta frequência se distribui por faixa etária?
- Quais os fatores associados a esta distribuição (culturais, imunológicos, ou outros)?
- Que fatores estão associados ao estado de portador de HPV e *Chlamydia trachomatis*?

CONCLUSÕES

Em nosso estudo, a prevalência de infecção genital por HPV foi de 28,4% (n=346/1217), tendo as variáveis cor não branca, ocupação (lar e assalariadas) e história de condiloma no parceiro associadas a esta infecção.

A infecção por *Chlamydia trachomatis* apresentou uma prevalência de 12,6% (n=152/1208), tendo as variáveis ocupação (lar e assalariadas) e sexarca inferior aos 20 anos de idade associadas a esta infecção.

Já a prevalência de co-infecção por HPV e *Chlamydia trachomatis* foi de 6,5% (n=78/1208), tendo a variável parceiros sexuais na vida associada a esta co-infecção.

Com relação à citologia houve associação significativa com a presença de HPV e de co-infecção.

A maior prevalência de HPV ocorreu entre mulheres com idade igual ou maior a 65 anos, seguido pelas mulheres com idade igual ou menor a 24 anos. Com relação à *Chlamydia trachomatis*, a prevalência maior foi observada em mulheres com idade igual ou menor a 24 anos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Compreender melhor as associações observadas no acompanhamento destas mulheres (estudo de coorte);
- Conhecer outras associações no decorrer do estudo de seguimento;
- Identificar grupos de risco que necessitem um acompanhamento mais freqüente;
- Contribuir no planejamento e qualificação de programas de controle e prevenção de Doenças Sexualmente Transmissíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical Cancer, Treatment, and Prevention. Clin Lab Sci 2001; 14(03):183-186.
2. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Bozzetti MC *et al.* Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. Rev Saúde Pública 2002 Feb; 36(1):95-100.
3. Centers for Disease Control and Prevention. USPHS/IDSA guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. Centers for Disease Control and Prevention 1998; 47 (RR-1) P.45.
4. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. J Infect Dis 1999 Nov; 180(5):1415-1423.
5. Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M *et al.* Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2002 Aug; 43(4): 277-281.
6. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. J Infect Dis 2002 Feb 1; 185(3):324-331.

7. Finan RR, Tamim H, Almawi WY. Identification of *Chlamydia trachomatis* DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal e abnormal cytology. Arch Gynecol Obstet 2002 Jul; 266(3):168-171.
8. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human papillomavirus Infection and Neoplasia. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31:14-19.
9. Ministério da Saúde. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2003. Instituto Nacional do Câncer/Pró-Onco/Inca 2003. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 12 dezembro/2004.
10. Ministério da Saúde. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2005. Instituto Nacional do Câncer/Pró-Onco/Inca 2005. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 20 maio/2005.
11. Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV *et al*. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. Diagn Cytopathol 2003 Sep; 29(3):149-155.
12. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol 2005 March; 32Suppl 1:S16-S24.
13. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human Papillomavirus and cervical cancer - burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31:3-13.

14. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C *et al.* Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002 Oct 9; 288(14):1749-1757
15. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL *et al.* Multiple high-risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004 Jan; 57(1):68-72.
16. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999 Jun 2; 91(11):954-960.
17. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP *et al.* Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003 March; 98(2):181-184.
18. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998 Feb 12; 338(7):423-428.
19. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6; 348(6): 518-527.

20. Becker TM, Stone KM, Alexander ER. Genital human papillomavirus infection. A growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1987 Jun; 14(2):389-396.
21. af Geijerstam V, Wang Z, Lewensohn-Fuchs I, Eklund C *et al.* Trends in seroprevalence of human papillomavirus type 16 among pregnant women in Stockholm, Sweden, during 1969-1989. *Int J Cancer* 1998 May 4; 76(3):341-344.
22. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S *et al.* Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 2002 Aug 15; 186(4):462-469.
23. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H *et al.* The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Jun; 12(6):485-490.
24. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A *et al.* Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001 Jun 9;357(9271):1831-1836.
25. Laukkanen P, Koskela P, Pukkala E, Dillner J *et al.* Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland. *J Gen Virol* 2003 Aug; 84(Pt 8):2105-2109.

26. Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL. *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2000 Feb; 6(2):88-93.
27. Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morré SA *et al.* Prevalence and determinants of *Chlamydia trachomatis* infections in women from Bogotá, Colômbia. *Sex Transm Infect* 2003 Dec; 79(6): 474-478.
28. Vincelette J, Schirm J, Bogard M, Bourgault AM *et al.* Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1999 Jan; 37(1):74-80.
29. Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM *et al.* *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol* 2005 Jan; 96(1):181-186.
30. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA: US 2002. P. 190.
31. Ramos MC, Becker D, Germany C. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela Reação em cadeia da Polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. *J Bras DST* 2003; 15(2):12.

32. Ramos MC, Becker D, Perin MT. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples of men with urethritides in a public STD clinic in Porto Alegre, Brazil. *Int J STD and AIDS* 2002; 13(1):47.
33. Miranda AE, Szcwaecwald CL, Peres RL, Page-Schafer K *et al.* Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis* 2004 Sep; 31(9):542-546.
34. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S *et al.* Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis* 2003 Apr; 7(2):91-95.
35. Stamm WE, Jones RB, Batteiger BE. Chlamydial Diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. USA: New York: Elsevier Churchill Livingstone 2005; 2(Pt3):2236-2255.
36. Kahn RH, Mosure DJ, Blank S, Kent CK *et al.* *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* prevalence and coinfection in adolescents entering selected US Juvenile Detention Centers, 1997-2002. *Sex Transm Dis* 2005 Apr; 32(4):255-259.
37. de Lima Soares V, de Mesquita AM, Cavalcanti FG, Silva ZP *et al.* Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Tro Med Int Health* 2003 Jul; 8(7):595-603.

38. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T *et al.* A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002 Oct 1; 101:371-374.
39. Becker D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por Reação em Cadeia da Polimerase (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular 2005. P. 90.
40. Manhony JB, Coombes BK, Chernesky MA. *Chlamydia* and *Chlamydophila* In: *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press 2003; P. 991-1004.
41. Dallabeta G, Laga M, Lamptey P. Controle de doenças sexualmente transmissíveis. *Manual de Planejamento e Coordenação de Programas*. Associação Saúde da Família. São Paulo 1996. P. 145.
42. Black MC. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Reviews*. 1997; 1:160-184.
43. Villa LL. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 321-341.

44. Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin* 2001 March-Apr; 51(2): 92-114.
45. Genest DR, Stein L, Cibas E, Sheets E *et al.* A binary (Bethesda) system for classifying cervical cancer precursors: criteria, reproducibility, and viral correlates. *Hum Pathol* 1993 Jul; 24(7): 730-736.
46. Zür Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186:131-156.
47. Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *N Engl. J Med* 1996 Apr 18; 344(16):1030-1038.
48. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M *et al.* Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 1996 Oct; 174(4):679-689.
49. Tarkowski TA, Koumans EH, Sawyer M, Pierce A *et al.* Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J Infect Dis* 2004 Jan 1; 189(1):46-50.
50. Wang SS, Schiffman M, Shields TS, Herrero R *et al.* Seroprevalence of human papillomavirus -16, -18, -31 and -45 in a population-based cohort of 10,000 women in Costa Rica. *Br J Cancer* 2003 Oct 6; 89(7):1248-1254.

51. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE *et al.* Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003 Feb 1; 157(3):218-226.
52. Brinton LA, Schairer C, Haenszel W, Stalley P *et al.* Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *JAMA* 1986 Jun 20; 255(23):3265-3269.
53. Burger MP, Hollema H, Gouw AS, Pieters WJ. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *Br Med J* 1993 March 20; 306(6880):749-752.
54. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jun 18; 89(12):868-873.
55. Yang YY, Koh LW, Tsai JH, Tsai CH *et al.* Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37:282-287.
56. Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e patogênese do Papilomavírus Humano (HPV). In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural 2000. P. 143.

57. Champion MJ, Greenberg MD, Kazamel TIG. Manifestações clínicas e história natural das infecções pelo papilomavírus humano. In: Lorincz AT, Reid R (ed.) Papailomavírus Humano II. Clin Obstet Ginecol Am Norte. Rio de Janeiro, Interlivros, 1996; 759-786.

58. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2000 May 3; 92(9):709-720.

59. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Haya Kawa H *et al.* Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. J Virol 2004 Nov; 78(21):11451-11460.

60. Howley PM. *Papillomavirinae*: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM editores. Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincot-Raven 1996; P. 2045-2076.

61. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU *et al.* Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. J Virol 1995 May; 69(5):3074-3083.

62. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI *et al.* Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. Oncogene 2003 Feb 27; 22(8):1225-1237.

63. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisuljov F *et al.* A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 2003 Jun 19; 22(25):3977-3984.
64. Zür Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections: Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 1986 Aug 30; 2(8505):489-491.
65. Rapp L, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 19; 1378(1):1-19.
66. Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol* 200 Aug; 53(4):201-206.
67. Ferenczy A, Mitao J, Nagai N. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med* 1985 Sep 26; 313(13):784-788.
68. Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural 2000; P. 143.
69. Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M *et al.* Sexually transmitted papillomaviral infections I: the anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 1987 Jan; 156(1):212-222.

70. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J *et al.* Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1997 Jun 4; 89(11):796-802.
71. Jacyntho C, Almeida Filho G, Maldonado P. HPV: Infecção Genital Feminina e Masculina. São Paulo: Revinter 1994. P. 124.
72. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG *et al.* Determinants of genital papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993 Sep-Oct; 20(5):274-278.
73. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995 Jun 7; 87(11):796-802.
74. Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC *et al.* Manual of clinical Microbiology. 7th ed. Washington, D.C: ASM Press 1999. P. 1773.
75. Griffais R, Thibon M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1989 Feb; 140(2):139-141.

76. Schachter J, Stamm EW. *Chlamydia trachomatis*. In: Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, D.C.: ASM Press 1999. P. 669-677.
77. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991 March; 55(1):143-190.
78. Comanducci M, Ricci S, Cevenini R, Ratti G. Diversity of the *Chlamydia trachomatis* common plasmid in biovars with different pathogenicity. *Plasmid* 1990 March; 23(2):149-154.
79. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J *et al.* Genome sequence of an obligate intracellular pathogens of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998 Oct 23; 282(5389):754-759.
80. Thomas NS, Luscher M, Storey CC, Clarke In. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology* 1997 Jun; 143(Pt6):1847-1854.
81. Farencena A, Comanducci M, Donati M, Ratti G *et al.* Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect Immun* 1997 Jul; 65(7):2965-2969.

82. Miyashita N, Matsumoto A, Fukano H, Niki Y *et al.* The 7,5-Kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Chemother* 2001 Jun; 7(2):113-116.
83. Hall SG. *Chlamydia trachomatis*: Update on laboratory diagnosis. *Check Sample*. *ASCP* 1997; 49(4):49-61.
84. Dores GB, Taromaru EK, Gallo C. Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV-induzidas e do câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. *NewsLab* 1999; 35: 196-205.
85. De Palo G, Stefanan B, Pillotti S. Infecção pelo Papilomavírus. In: De Palo G editor. *Colposcopia e patologia do trato genital inferior*. Rio de Janeiro: Medsi 1996. P.125-89.
86. Francisco W. Gonococcias e Clamídias. In: Ferreira AW & Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1996. P. 101-108.
87. Warford A, Chernesky M, Peterson EM. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press 2003. P. 2-18.

88. Weinstock H, Dean D, Bolan G. *Chlamydia trachomatis* infections in Sexually Transmitted Diseases in the AIDS Era: Part II. *Infect Dis Clin North Am* 1994 Dec; 8(4): 797-819.
89. Hills DS, Wasserhiet NJ. Screening for *Chlamydia trachomatis* – A key to the prevention of pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997; 334(21):1399-1401.
90. Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M, Bobo L. Epidemiologic and microbiology Correlates of *Chlamydia trachomatis* Infection in Sexual Partnerships. *JAMA* 1996 Dec 4; 276(2):1737-1742.
91. Gaydos C, Crotchfelt AK, Howell MR, Kralian S *et al.* Molecular amplification assays to detect Chlamydial infections in urine specimens from High School Female Students and monitor the persistence of Chlamydial DNA after therapy. *J Infect Dis* 1998 Feb; 177(2):417-424.
92. Bowe RW, King KH. *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). In: *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone Inc 1995. P. 3263.
93. Gross GE, Barrasso R. Infecção pelo papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas 1999. P. 431.

94. Patton DL, Wang SK, Kuo CC. In vitro activity of monoxynol 9 on HeLa 299 cells and primary monkey cervical epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992 Jul; 36(2):1478-1482.
95. Roddy RE, Zekeng L, Ryan KA, Tamoufe U *et al.* A controlled trial of monoxynol 9 film to reduce male-to-female transmission of sexually transmitted diseases. *N Engl J Med* 1998 Aug 20; 339(8):504-510.
96. Martin DH, Mroczkowski TF, Dalu ZA, McCarty J *et al.* A controlled trial of a single dose of azithromycin for the treatment of chlamydial urethritis and cervicitis. *N Engl J Med* 1992 Sep 24; 327(13):921-925.
97. Bauer HM, Ce Greer R, Mannos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR. In: Herrington CS, McGee JD editores. *Diagnostic molecular pathology: a practical approach*. England: Oxford University Press 1992. P. 224.
98. Ronco G. Use of molecular tests of human papillomavirus (HPV) as screening test for cervix cancer: a review. *Epidemiol Prev* 1999 Oct-Dec; 23(4):372-377.
99. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy. *JAMA* 1989 Feb 3; 261(5):737-743.
100. Merlo JG. *Diagnostico precoz del cáncer genital femenino*. Salvat Editores 1981. P. 31-62.

101. Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K *et al.* Prevalence of Antibodies to Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Virus-Like Particles in Relation to Cervical HPV Infection among College Women. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 March; 4(2):122-26.
102. Coutlée F, Maurand MH, Provenchier D, Franco F *et al.* The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* 1997 Aug; 8(2):123-141.
103. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separate by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975 Nov 5; 98(3):503-517.
104. Birner P, Bachtary B, Dreier B, Schindl M *et al.* Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. *Mod Pathol* 2001 Jul; 14(7):702-709.
105. Wiedorn KH, Goldmann T, Henne C, Kuhl H *et al.* EnVision⁺, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH). *J Histochem Cytochem* 2001 Sep; 49(9):1067-1071.
106. Komminoth P, Werner M. Target and signal amplification: approaches to increase the sensitivity of in situ hybridization. *Histochem Cell Biol* 1997 Oct-Nov; 108(4-5):325-333.

107. Captura Híbrida (Digene). <http://www.digene.com.br>. Acesso em: 15 janeiro/2005.
108. Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K *et al.* Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection - comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1998 Oct; 51(10):737-740.
109. Zür Hausen H, Meinhof W, Schreiber W, Bornkamm GM. Attempts to detect virus-specific sequences in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974 May 15; 13(5):650-656.
110. Peyton CL, Schiffman MS, Lörincz AT, Hunt WC *et al.* Comparison of PCR- and hybrid Capture based human Papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microb* 1998 Nov; 36(11):3248-3254.
111. De Villiers EM. Papillomavirus and HPV typing. In: Jablonska S, Orth G editores. *Clinics in Dermatology, Papillomaviruses*. New York: Elsevier Science 1997. P. 199-206.
112. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol* 1987; 155:335-50.

113. Tham KM, Chow VT, Singh P, Tock EP. Diagnostic sensitivity of polymerase chain reaction and southern blot hybridization for the detection of human papillomavirus DNA in biopsy specimens from cervical lesions. *Am J Clin Pathol* 1991 May; 95(5):638-646.

114. Kletter B, Van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L *et al.* Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 1998 Dec; 153(6):1731-1739.

115. Coursaget P. Serology for human papillomavirus. *Salud Pub Mex* 2003; 45(3):361-66.

116. Galloway DA. Serological assays for the detection of HPV antibodies. *IARC Sci Publ* 1992; 1(19):147-61.

117. LeBar DW. Keeping up with new technology: new approaches to diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *Clin Chem* 1996 May; 42(5):809-812.

118. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases clinical practice guidelines. Centers for Disease Control and Prevention 1993. P. 45.

119. Grayston JT. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis* 1992 Nov; 15(4):757-761.

120. Numazaki K. Serological tests for *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1998 Jan; 11(1):228-229.
121. Kritski LA, Rossetti ML, Bonfim G. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. Pneumol 1997; 23(1):33-42.
122. Caliendo AM. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infection Using Amplification Methods: Can We Afford It? Clin Microbiol Newsletter 1998; 20(9):75-78.
123. Lan J, Walboomers JM, Roosendaal R, Van Doornum GJ. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1993 May; 31(5):1060-1065.
124. Girdner J, Cullen AP, Salama TG, He L *et al.* Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. J Clin Microbiol 1999 May; 37(5):1579-1581.
125. van Der Pol B, Williams JA, Smith NJ, Batteiger BE *et al.* Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the rapid capture system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2002 Oct; 40(10):3558-3364.

ARTIGO

Infecção Genital pelo Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) em mulheres assintomáticas: prevalência, fatores associados e relação com lesões cervicais.

Cristine Nascente Igansi, Regina Bones Barcellos, Viviane Kubisszewski, Elizabeth Cortez-Herrera, Daniela Becker, Marilda Tereza Mar da Rosa, Luciane Millius, Alexandre Aguiar, Daniela Montano, Maria Lúcia Rossetti, Mary Clarisse Bozzetti.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência para autor: Cristine Nascente Igansi, Residencial Aços Finos Piratini, Núcleo D-67, casa 675, Charqueadas, RS - Brasil.

CEP: 96745-000

Fone: +55 51 84117004

E-mail: crishpv@yahoo.com.br

mcb@famed.ufrgs.br

Resumo

Objetivos: O presente estudo teve como objetivos conhecer a prevalência de infecção genital por Papilomavírus Humano (HPV) e por *Chlamydia trachomatis* (CT) em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, e verificar a associação destas infecções com fatores estudados e com a presença de lesões cervicais.

Método: Trata-se de um estudo transversal cujo desfecho é a infecção genital por HPV e por *Chlamydia trachomatis* em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre. Foram coletadas amostras de material cervical de um total de 1217 mulheres arroladas para o estudo para a realização do exame citopatológico (CP) e para a identificação do DNA-HPV e DNA-CT através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Colposcopia e biópsia foram realizadas sempre que o CP estivesse alterado e/ou a PCR para o HPV-DNA fosse positiva. A frequência de HPV, de CT, e de co-infecção por ambos, e as distribuições destas infecções por faixa etária são descritas, bem como a associação das mesmas com as variáveis estudadas através das Razões de Chance (RC) estimadas por regressão logística múltipla.

Resultados: Observou-se uma prevalência de HPV-DNA de 28,4% (n=346), de CT-DNA de 12,6% (n=152) e de co-infecção por HPV e CT de 6,5% (n=78). Mulheres não brancas (Razão de Chance (RC) =1,60; Intervalo de Confiança (IC) de 95%:1,10-2,38), assalariadas (RC=1,74; IC95%:1,17-2,60) e com parceiro apresentando história de condiloma genital (RC=2,35; IC95%:1,17-4,72) mostraram-se associadas com a positividade para HPV. A infecção por CT mostrou uma associação positiva com mulheres que iniciaram a vida sexual antes dos vinte anos (RC=1,82; IC95%:1,05-3,15) e assalariadas (RC=1,93; IC95%:1,15-3,25). Quanto à co-infecção por HPV e CT, mulheres com mais de três parceiros sexuais na vida (RC=2,02; IC 95%:1,12-3,65) apresentaram uma associação positiva com o

desfecho. Observou-se também uma associação significativa com anormalidades citológicas ($p \leq 0,001$) tanto para a infecção por HPV quanto para a co-infecção por HPV e CT.

Conclusão: Os resultados mostraram uma elevada prevalência de HPV, CT e de co-infecção em uma amostra de mulheres assintomáticas, reforçando dados relatados na literatura. A associação destas infecções com variáveis sócio-econômicas, de comportamento sexual e com lesões do colo uterino, indica a importância de medidas para promoção e prevenção de saúde com este alvo específico dentro da rotina de serviços de atenção primária. Desta forma, acredita-se que estes achados possam ser muito úteis no planejamento de programas, incluindo o controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis e a utilização de vacinas para o HPV.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano, *Chlamydia trachomatis*, Reação em Cadeia da Polimerase, co-infecção, câncer de colo de útero.

Abstract

Objective: The present study has the aim of describing the prevalence of HPV and *Chlamydia trachomatis* (CT) among non symptomatic women in our setting and as well to associate these infections with studied factors, including cervical lesions.

Methods: A cross-sectional study was developed with HPV-DNA and CT-DNA positivity as the outcome. Cervical smears for cytology were collected from 1217 women and Polymerase Chain Reaction (PCR) was the method used to identify the presence of HPV-DNA and CT-DNA. Colposcopy and biopsy were performed whenever cytology was abnormal and/or PCR was positive to HPV-DNA. HPV-DNA and CT-DNA frequencies are described and the association with the studied variables and the outcomes were estimated by means of multiple logistic regression.

Results: The observed HPV-DNA, CT and co-infection prevalences were 28.4%, 12.6%, and 6,5%, respectively. Non White women (Odds Ratio (OR)=1.60; 95% Confidence Interval (CI):1.10-2.38), being employed (OR=1.74; 95%CI:1.17-2.60) and having a sexual partner with history of condyloma (OR=2.35; 95%CI:1.17-4.72) showed positive association with HPV infection. The CT infection presented a positive association with women beginning sexual activity before 20 years of age (OR=1.82; 95%CI:1.05-3.15) and women employed (OR=1.93; 95%CI:1.15-3.25). Women that reported 3 or more sexual partners during their life showed a positive association with co-infection by HPV and CT (OR=2.02; 95%CI:1.12-3.65). Both, HPV infection and Co-infection were associated with the presence of citological abnormalities of the cervix ($p \leq 0.001$).

Conclusion: An elevated HPV, CT and co-infection prevalence was observed in an asymptomatic women population, which is in agreement with findings reported in the

literature. The association of these infections with socioeconomic factors, sexual behavior and with cervical lesions indicates the importance of measures in health promotion and in health prevention with this specific target as a routine activity in primary care services. The present results may be usefull in planning such strategies, including sexual transmitted diseases controls programs and HPV vaccines utilization.

Key Words: Human Papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, Polymerase Chain Reaction, cross-sectional study, cervical cancer.

Introdução

O câncer cervical acomete anualmente cerca de 470.000 mulheres em todo o mundo (1). No Brasil, são diagnosticados mais de 16.000 casos ao ano de câncer cervical, sendo que 10 mulheres morrem por dia devido a esta enfermidade (2, 3).

Segundo Franco *et al* (2001), a infecção pelo HPV é considerada a causa principal da maioria dos casos de câncer cervical, sendo um dos tumores malignos mais frequentes na população brasileira, e de uma pequena fração dos casos de câncer vaginal, vulvar, peniano e anal (5). As taxas de aquisição de infecções por HPV são elevadas, principalmente em adultos jovens sexualmente ativos, sendo que as estimativas da prevalência das infecções entre mulheres no mundo variam de 2,0% a 44,0% (6, 7).

Além do HPV, outros estudos têm sido realizados na tentativa de verificar o papel da *Chlamydia trachomatis* (CT) como um co-fator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com história de infecção por HPV (8, 9).

A infecção urogenital por CT é um importante problema de saúde pública, sendo considerado uma das principais causas de morbidade em indivíduos sexualmente ativos, com uma estimativa de 89 milhões de novos casos ocorrendo anualmente em todo o mundo, sendo que indivíduos não tratados servem como reservatório para a transmissão da infecção aos parceiros sexuais (8, 9).

A infecção genital por CT é estudada como um co-fator no desenvolvimento de NICs e outras alterações celulares significativas em mulheres com história de infecção por HPV, resultando também em cervicites mucopurulentas crônicas, uretrites, doença inflamatória pélvica (18,0% a 24,0%) e endometriose (6,0% a 21,0%) (10, 11).

Mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 20 anos são as mais acometidas pela infecção por CT, sendo observada uma prevalência nesta faixa etária de 10,0%, porém, em clínicas de DST estes índices podem chegar a 40,0%.

As diferenças anatômicas na cérvix uterina, entre as mulheres, podem favorecer uma maior ou menor exposição ao agente etiológico. Além disso, há outras variáveis sabidamente associadas à infecção por CT e HPV, como nuliparidade, ser solteira, raça negra e baixa condição sócio-econômica, bem como a não utilização de preservativos nas relações sexuais e infecções gonocócicas concomitantes (12, 13, 14, 15).

Na tentativa de conhecer a prevalência de infecções genitais por HPV, CT e co-infecção por HPV e CT, em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre e de verificar a associação destas infecções com os fatores estudados, em especial com a presença de lesões cervicais, planejou-se este estudo. Espera-se que os achados possam contribuir para uma melhor compreensão dos importantes problemas de saúde pública relacionados às Doenças Sexualmente Transmissíveis e às causas de morbidade e mortalidade por câncer cervical em nosso meio, já que esta é uma neoplasia com elevado potencial de prevenção e de cura, se detectada precocemente.

Material e Métodos

Delineamento do Estudo

Estudo transversal envolvendo mulheres assintomáticas de uma área populacional assistida pela Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, pertencente ao Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição, localizada na Zona Norte de Porto Alegre, as quais foram selecionadas para participar de um estudo de coorte com seguimento mínimo de cinco anos.

População e Amostra

A população do estudo é originária da população de mulheres pertencentes à área de abrangência da Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, sendo que existem aproximadamente 7000 mulheres adultas residindo nesta área (16).

Para participar do estudo, as mulheres necessitavam buscar atendimento na Unidade Jardim Leopoldina, preencher os critérios de elegibilidade e concordar em participar do estudo assinando um Termo de Consentimento Informado. Para ser elegível a mulher teria que pertencer à área geográfica da unidade acima descrita, possuir prontuário na Unidade referida e registro no Hospital Nossa Senhora da Conceição, ter iniciado vida sexual, estar assintomática, não ter história de câncer cervical e não ter sido histerectomizada.

A amostra deste estudo compreendeu um total de 1217 mulheres arroladas no período de fevereiro de 2003 até abril de 2005 e que representam resultados parciais de um estudo de coorte.

Variáveis do Estudo

O desfecho foi a detecção por PCR de HPV-DNA e CT-DNA. Após terem sido arroladas, as participantes responderam a um questionário epidemiológico padronizado onde foram coletadas informações sobre características demográficas, morbidades pregressas, história de vida reprodutiva e de comportamento sexual. Todas as mulheres do estudo foram submetidas a um exame ginecológico onde foram coletados materiais para citologia convencional (CP) e teste do HPV-DNA e CT-DNA, ambos através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A citologia, para fins de análise estatística, foi categorizada como normal, lesão de baixo grau (neste grupo foram incluídas as alterações como AGUS, ASCUS, HPV e NIC I) e lesão de alto grau (NIC II, III e câncer invasor).

O exame de colposcopia foi realizado sempre que o CP estivesse alterado e/ou a PCR para o HPV-DNA fosse positiva, sendo que a biópsia somente era realizada em mulheres que apresentavam colposcopia alterada. Para fins de análise, esta variável foi categorizada em colposcopia “normal” e colposcopia “anormal”.

Os resultados das biópsias foram analisados em três categorias: normal, lesão de baixo grau (NIC I) e lesão de alto grau (NIC II, III e câncer invasor).

Teste de Especificidade Analítica dos Primers para HPV e CT

A especificidade dos *primers* para o diagnóstico de HPV e *Chlamydia trachomatis* foi realizada a partir da contaminação de amostras clínicas com diferentes microrganismos da microbiota normal do trato genito-urinário feminino e agentes patogênicos. Os DNAs de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*, *Trichomonas*

vaginalis e *Lactobacillus sp.* foram extraídos e purificados pelo método de CTAB (Cloreto de cetil-trimetil-amônio) descrito por van Soolingen e colaboradores (1994).

Após realizada a PCR, com as temperaturas de anelamento adequadas, e análise em gel de agarose, verificou-se que os *primers* foram específicos somente para a detecção de HPV e *Chlamydia trachomatis*.

Teste de Sensibilidade Analítica dos Primers para HPV e CT

O DNA-HPV foi extraído a partir de células Siha e Caski (células infectadas com HPV). As amostras foram submetidas à extração de DNA pelo método de Proteinase K (18) e quantificado por espectrofotometria a 260nm no equipamento Genequant (Amersham Pharmacia Biotech).

Com relação à *Chlamydia trachomatis*, o DNA-CT foi extraído a partir de lâminas sensibilizadas com células clamidiais (*Chlamydia trachomatis* IgG IFA, Hemagen Diagnostics, Inc.). As lâminas foram raspadas com lâmina de bisturi e o material eluído e concentrado em tubo de microcentrífuga. A seguir, foi realizada a extração através de kit comercial *Ultra Clean* (Mobio Laboratories Inc.). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm no equipamento Genequant (Amersham Pharmacia Biotech).

Para a determinação da sensibilidade analítica da técnica, tanto para HPV quanto para *Chlamydia trachomatis*, foi submetida diluições seriadas de DNA em água ultrapura ao protocolo de PCR, com detecção em gel de agarose, e à técnica de hibridização.

A sensibilidade analítica (limiar de detecção) para o HPV foi de 80fg/μl (242 cópias virais). Para CT, a sensibilidade foi de 300 fg/μl (225UFI).

Teste de Especificidade e Sensibilidade Clínica para HPV e CT

Para o HPV, testes pilotos com 38 amostras envolvendo a técnica de PCR e Captura Híbrida foram realizados. Destas, 33 amostras foram negativas para HPV em ambos os testes; 3 amostras foram positivas tanto na PCR quanto na Captura Híbrida; e somente duas amostras discordaram (PCR positivo e Captura negativa). Portanto, a especificidade foi de 94,0% e a sensibilidade de 100,0% no teste de PCR.

Com relação a *Chlamydia trachomatis*, testes pilotos com 92 amostras envolvendo Captura Híbrida e PCR foram realizados. Destas, 50 amostras foram positivas e 42 amostras negativas para CT no teste de Captura Híbrida; no teste de PCR, das 50 amostras positivas na Captura Híbrida, 45 foram confirmadas e das 42 amostras negativas, 38 foram negativas para CT no teste de PCR. Portanto, a especificidade e a sensibilidade clínica foram de 95,0% e 97,0%.

Detecção do HPV-DNA por PCR

A técnica de PCR para o diagnóstico de HPV foi anteriormente descrita por Bauer HM *et al* (1993) e Coutlée F *et al* (2002).

As amostras para a pesquisa de HPV-DNA e CT-DNA foram coletadas na Unidade de Saúde de Atenção Primária do Posto Jardim Leopoldina, utilizando-se escova do tipo “*cytobrush*” e estocadas à temperatura de -20°C em 2 ml de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,5; 1mM EDTA) até a extração do DNA. O transporte das amostras foi realizado em condições de baixas temperaturas (-20°C).

Após descongelamento, as amostras foram submetidas à extração de DNA através de solução Proteinase K/TE-50 (200 µg/ml de proteinase K 'DNase/RNa free' Gibco, 2% Tween 20, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,5) e deixadas em banho-maria por 18 horas. Após inativação a 94°C durante 10 min, 5µL de cada amostra desproteinizada foi submetida a amplificação por PCR (19, 20, 21).

Para a detecção do HPV, utilizou-se como *primers consensus* os seguintes oligonucleotídeos degenerados, complementares à região L1 do genoma viral do papilomavírus humano (1, 2, 20, 22, 23):

My 09 5'... CGT CC^A/_C AA^A/_G GGA ^A/_TAC TGA TC... 3'

My 11 5'... GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG... 3'

As reações foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), *primers* na concentração de 50ng/µL cada, 3,0mM de MgCl₂, 200µM de cada DNTP (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl, 5µL de DNA e H₂O q.s.p.

As seguintes condições foram utilizadas para amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96: 95°C por 13 min, para desnaturação; 40 ciclos subsequentes de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, para amplificação; 72°C por 5 min, para extensão final; 4°C para estoque dos produtos amplificados.

Detecção de CT-DNA por PCR

A técnica de PCR para o diagnóstico de CT foi padronizada por Becker D (2005).

O DNA das amostras clínicas foi submetido à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) para CT, utilizando-se os *primers* CTP1 e CTP2 que flanqueiam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico de *Chlamydia trachomatis* (14, 23, 24). Este segmento localiza-se a 2940pb do sítio único de restrição de BamHI:

CTP1 5'... TAGTAACTGCCACTTCATCA... 3'

CTP2 5'... TTCCCCTTGTAATTCGTTGC... 3'

As reações foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2,5U da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), *primers* na concentração de 12,50 pmol cada, 3,0mM de MgCl₂, 200µM de cada DNTP (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl, 5µL de DNA e H₂O q.s.p.

As seguintes condições serão utilizadas para amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96: 94°C por 1 min, para ativação da enzima *Taq Platinum*, 95°C por 4 min, para desnaturação; 40 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de: uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 66°C por 1 min e uma etapa de 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final, uma etapa de 72°C por 4 minutos, para extensão final.

Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,5%, em tampão TBE contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio, sob luz ultravioleta e comparados a um controle positivo de reação da PCR.

Para controlar o funcionamento das reações, foi ensaiado, juntamente com cada PCR de DNA de amostras clínicas, um controle positivo de reação, que consistiu de um fragmento de

450pb correspondente às células Caski e Siha (células infectadas com o vírus HPV) e um fragmento de 201pb corresponde a células infectadas por CT; e um controle negativo de reação com omissão de qualquer DNA. Em todas as amostras testadas foi utilizado *primers* complementares ao gene da β -globina humana como controle interno da reação.

Exame Citopatológico (CP)

As lâminas com esfregaço para citologia e as biópsias foram processadas e analisadas junto ao Laboratório de Patologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição. As participantes do estudo que apresentaram alterações no exame citológico e/ou foram HPV-DNA positivas realizaram colposcopia e biópsia de colo uterino se necessário. As mulheres diagnosticadas com alterações que necessitaram tratamento imediato (NIC II, III, câncer *in situ*, câncer invasor) foram encaminhadas ao Serviço de Referência para tratamento.

As informações coletadas foram armazenadas sistematicamente em um banco de dados desenvolvido no programa SPSS 10.0. O controle de qualidade de entrada dos dados foi feito através de conferência sistemática dos dados até então digitados com o questionário original de uma amostra aleatória de 20% dos registros já armazenados.

Análise dos Dados

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS (versão 10.0). Foi descrita a frequência de HPV-DNA, de CT-DNA e de co-infecção para toda a amostra estudada e por faixa etária. O teste do qui-quadrado (ou exato de Fisher se indicado) foi utilizado para comparar as variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho e o teste *t de student* (ou não paramétrico correspondente) para comparar as variáveis contínuas

com a presença ou não do desfecho. A Razão de Chances (RC) foi calculada para as análises uni/bivariadas e multivariadas, através do método de Regressão Logística, com seu correspondente Intervalo de Confiança de 95%. Os critérios de seleção das variáveis para o modelo de regressão logística não condicional envolveram a significância estatística na análise uni/bivariada e/ou a relevância clínico-epidemiológica da variável mediante o conhecimento vigente. Todas as variáveis com $p \leq 0,25$ foram incluídas no modelo, utilizando-se o método ENTER, o qual mantém todas as variáveis selecionadas no modelo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição em 15 de janeiro de 2003, protocolo número 112/2002.

Resultados

A positividade de HPV-DNA, pela técnica de PCR, em toda a amostra estudada, foi de 28,4% (n=346/1217). Já em relação à CT, em toda a amostra estudada, 12,6% (n=152/1208) das mulheres eram positivas e 6,5% (n=78/1208) apresentaram co-infecção para HPV e CT. O total amostral para cada um dos grupos das mono-infecções por HPV e por CT, apresenta uma diferença de 9 mulheres. Nesta o material cervical coletado foi insuficiente para realizar o segundo teste (PCR-CT).

Na tabela 1 está descrita a distribuição das variáveis estudadas e sua associação com a presença de HPV e CT. Observa-se que houve diferença significativa entre as mulheres positivas e negativas para o HPV em relação às variáveis cor ($p=0,02$), ocupação ($p=0,001$), estado marital ($p=0,01$), parceiros sexuais na vida ($p=0,01$) e história de condiloma genital no parceiro ($p=0,006$). Quanto à presença ou ausência de infecção por CT, observa-se que as

variáveis ocupação ($p=0,02$) e sexarca ($p=0,003$) apresentaram diferença significativa, nesta análise.

Na tabela 2 está descrita a distribuição das variáveis estudadas de acordo com a presença de Co-Infecção por HPV e CT. Nesta análise estão excluídas as mono-infecções por HPV ou por CT e mulheres sem nenhuma destas infecções. Neste grupo, observa-se que as variáveis cor ($p=0,05$), história de clamídia genital ($p=0,05$) e número de parceiros sexuais na vida ($p=0,06$) apresentaram associação com significância limítrofe.

Na tabela 3 estão descritos os achados do exame citopatológico, colposcópico e anatomopatológico, de acordo com a positividade ou não por HPV, CT e co-infecção. A citologia apresentou associação significativa à presença de HPV ($p<0,001$) e à presença de co-infecção ($p=0,001$). Entre as mulheres HPV positivas, a citologia com diagnóstico de lesão de baixo grau foi observada em 67,1% ($n=57/85$); entre as mulheres CT positivas este percentual foi de 12,9% ($n=11/85$), enquanto que entre mulheres co-infectadas, este percentual foi de 27,0% ($n=10/37$). Quanto às lesões de alto grau, o percentual entre as mulheres HPV positivas foi de 66,7% ($n=2/3$).

Do total de mulheres estudadas, 15,4% ($n=185$) foram encaminhadas à colposcopia e, destas, 27,0% ($n=50$) apresentaram anormalidades a este exame e realizaram biópsia. Da totalidade de biópsias realizadas, 68,0% ($n=34$) apresentaram alterações anatomopatológicas: 11,8% ($n=4$) mulheres tinham lesão de alto grau e 88,2% ($n=30$) lesões de baixo grau. Entre as mulheres com lesão de alto grau, 100,0% ($n=4$) foram positivas para HPV e 25,0% ($n=1$) foram positivas para CT e também apresentaram resultado positivo para a co-infecção por HPV e CT. Não foi observada associação significativa entre colposcopia e biópsia nos grupos analisados. Uma das justificativas para este achado pode estar relacionada ao pequeno número de mulheres que foram encaminhadas à colposcopia e que realizaram biópsia.

Na tabela 4 estão descritas as Razões de Chance ajustadas, com correspondentes intervalos de confiança de 95%, para a associação entre as variáveis estudadas e os desfechos. Observa-se uma associação positiva e significativa com a presença de HPV em mulheres não brancas (RC=1,60; IC95%:1,10-2,38), do lar e/ou assalariadas (RC=1,52; IC95%:1,05-2,21, RC=1,74; IC95%:1,17-2,60, respectivamente) e que relataram de história de condiloma genital no parceiro (RC=2,35; IC95%:1,17-4,72). Já em relação à CT, houve uma associação positiva e significativa com mulheres assalariadas (RC=1,93; IC95%=1,15-3,25) e sexarca anterior aos vinte anos (RC=1,82; IC95%:1,05-3,15). Quanto à co-infecção, observou-se uma associação estatisticamente significativa com mulheres que relataram mais de três parceiros ao longo da vida (RC=2,02; IC95%:1,12-3,65).

Na figura 1 está descrita a distribuição das frequências de HPV e *Chlamydia trachomatis* de acordo com as diferentes faixas etárias. Observou-se maior frequência de HPV nas faixas etárias de mulheres com idade maior ou igual a 65 anos, seguido pela faixa etária de mulheres com idade menor ou igual à 24 anos. Já quanto à infecção genital por CT, uma frequência maior é observada nas faixas etárias de mulheres mais jovens, particularmente nas com idade igual ou inferior a 24 anos.

Discussão

Os resultados deste estudo mostram uma elevada prevalência de positividade para HPV (28,4%), para CT (12,6%) e co-infecção (6,5%) na amostra estudada.

As prevalências observadas neste estudo estão dentro do amplo intervalo relatado na literatura, onde a prevalência e a incidência da infecção cervical pelo HPV, CT e co-infecção

mostram grande variação, de acordo com o método diagnóstico utilizado, mas também por refletir as variações quanto ao comportamento sexual entre as populações (21, 25).

No Brasil, esta variação também é observada. Um estudo realizado em uma população de uma cidade do interior do Rio Grande do Sul, considerada de baixo risco, foi encontrada uma frequência de HPV-DNA de 13,0% (26). Outro estudo realizado em São Paulo, entre mulheres de baixa renda, também referiu uma frequência de mulheres HPV positivas de 26,2% (27). A frequência de HPV observada em nosso estudo foi elevada (28,4%)

Com relação à CT, as frequências observadas em nosso estudo também estão de acordo com a literatura. Estudos epidemiológicos realizados na cidade de Vitória (ES), com mulheres assintomáticas e sexualmente ativas, constataram uma prevalência de 12,2% (28, 29). Já em outro estudo realizado em Manaus com 121 mulheres, a prevalência CT foi de 20,7% (30).

Ao avaliar a co-infecção de HPV com CT, nosso estudo encontrou uma positividade de 6,5% (n=78/1208), sendo que em toda a população arrolada, 28,4% (n=346/1217) apresentaram resultado confirmatório para HPV e 12,6% para CT (n=152/1208). Entretanto, Soares (2003), em um estudo realizado em Alagoas, Brasil, das 341 mulheres arroladas, 6,4% apresentaram resultado positivo para CT e 26,6% apresentaram resultado confirmatório para HPV (31).

Especula-se que estas frequências de HPV, de CT e de co-infecção estejam relacionadas com o tipo população estudada, que inclui baixa renda, múltiplos parceiros sexuais e precária cobertura para o rastreamento de câncer de colo uterino; e com o tipo de método diagnóstico utilizado, que cada vez mais, são mais sensíveis e possibilitam um melhor diagnóstico. Cabe salientar, no entanto, que frequências elevadas de HPV também tem sido observadas em mulheres com citologia normal e subsequente desenvolvimento de lesões intraepiteliais

escamosas da cérvix, sendo estes achados consistentes com a hipótese de a infecção pelo HPV ser causa necessária para o desenvolvimento de neoplasia cervical (32).

Apesar de o presente estudo ter arrolado uma amostra de mulheres assintomáticas de uma área geográfica de Porto Alegre, acredita-se que os achados possam ser extrapolados para a totalidade de mulheres da área de abrangência da Unidade de Saúde Jardim Leopoldina, onde a distribuição das características demográficas é semelhante à relatada na amostra estudada (16). No entanto, as mulheres estudadas relataram, em sua maioria, mais de três parceiros sexuais, sexarca anterior aos 20 anos e em torno de 27,8% referiram nenhuma escolaridade ou primeiro grau incompleto. Este padrão de comportamento de “risco” na população estudada deve ser considerado ao discutir-se os achados deste estudo.

Embora estudos realizados na Costa Rica (33), Colômbia e México (34), mostrem uma distribuição bi-modal da infecção pelo HPV quanto à faixa etária, sendo o primeiro pico abaixo dos 25 anos e o segundo pico acima dos 59 anos, outros estudos não observaram a mesma tendência (4, 21). Corroborando os achados dos estudos da Costa Rica (35), Colômbia e México (34), em nosso estudo, a distribuição da positividade do HPV também é bi-modal, sendo o maior percentual de positividade (42,4%) observado em mulheres com 65 anos ou mais e em mulheres com 24 anos ou menos (37,5%). Este dado pode sugerir que as mulheres com idade de 65 anos ou mais estejam com o sistema imunológico comprometido, facilitando uma manifestação latente do vírus HPV.

Já em relação à infecção genital por CT o mesmo não ocorre, e a maior frequência é observada nas faixas etárias mais jovens. Nosso achados, em relação à CT estão em concordância com os relatos de outros estudos indicando que esta infecção acomete mulheres mais jovens (35).

Em relação à citologia, as lesões de baixo grau observadas foram, em sua maioria, nas mulheres HPV positivas, embora 32,9% também tenha sido observado entre as HPV negativas. Este percentual de lesões de baixo grau encontradas em amostras negativas para HPV na PCR pode estar relacionado ao fato que ao coletar o material citopatológico, o local escolhido para a coleta não apresente um número suficiente de células infectadas, ou algum fator inibitório na reação (resíduos da extração, abundância de muco na amostra cervicovaginal) ou mesmo lesões do tipo ASCUS e AGUS que em nossa classificação, juntamente com NIC I, foram considerados de baixo grau. A maioria das lesões de alto grau (66,7%) estavam relacionadas ao HPV, sendo que estes achados refletem a expectativa de que lesões de alto grau, consideradas pré-malignas estejam associadas a presença de HPV oncogênico.

A CT esteve presente em 13,2% (n=120/905) dos exames citopatológicos normais, em 12,9% (n=11/85) das lesões de baixo grau, sendo que em lesões de alto grau não foram evidenciados a presença de DNA-CT. Com relação à co-infecção por HPV e CT, 27,0% (n=10/37) esteve presente em lesões de baixo grau. Este dado corrobora os achados de outro estudo realizado na Argentina (n=279), no qual a CT também esteve presente em lesões de baixo grau (41,8%) e, que juntamente com o HPV, possa contribuir de forma mais agressiva e mais rápida para o desenvolvimento de lesões pré-precursoras de lesões cervicais (9).

Sabe-se que a presença da infecção pelo HPV é um fator necessário, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (21, 36). Assim, outros fatores parecem contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia. Entre eles, fatores hormonais como elevada paridade associada a um longo período de exposição a anticoncepcionais orais, outras infecções genitais como a CT podem ser consideradas co-fatores do HPV (11, 37, 38).

Outros fatores também têm sido sugeridos como possíveis co-fatores, como déficit nutricional, fatores inerentes ao hospedeiro que aumentariam a suscetibilidade à infecção pelo HPV, como marcadores genéticos e moduladores da resposta imune e mesmo variantes genéticas de vários tipos de HPV (1, 21).

Segundo Smith JS e colaboradores (2002), em seu estudo realizado com 1038 mulheres, a variável sexarca se mostrou significativamente relacionada com a presença de CT em mulheres que tiveram a primeira relação com menos de 20 anos (RC=2,5; IC95%:1,3-4,6). Em nosso estudo, esta variável também apresentou associação significativa (RC=1,82; IC95%:1,05-3,15). Já em relação ao número de parceiros sexuais ao longo da vida, mulheres que relataram mais de três parceiros ao longo da vida apresentaram associação significativa com a presença de co-infecção (RC=2,02; IC95%:1,12-3,65). Este resultado também é corroborado no estudo de Smith JS e colaboradores (2002).

Com relação à comparação das variáveis do estudo atual com achados de outros estudos (Tabela 5), em nosso estudo, a variável parceiros sexuais na vida apresentou associação positiva com a presença de co-infecção e a variável sexarca, com a presença de *Chlamydia trachomatis*. Estes achados corroboram os resultados encontrados no estudo de Smith JS e colaboradores (2002).

Com relação à variável fumo, nosso estudo não encontrou associação positiva, mas Brinton LA e colaboradores (1986) sugerem o fumo como possível co-fator na infecção por HPV. A variável sem companheiro fixo, em nosso estudo, também não apresentou associação positiva. Porém, Chan PKS e colaboradores (2002), encontraram associação positiva com a presença de HPV.

Segundo Shields TS e colaboradores (2004), a variável escolaridade apresentou associação positiva com HPV, porém em nosso estudo este dado não foi evidenciado.

Já a variável cor não branca e história de condiloma no parceiro apresentaram associação positiva com a presença de HPV, corroborando os achados de Hankins C (1999) e Rousseau MC (2003), respectivamente.

O fumo, mesmo sendo passivo, tem sido sugerido como fator relacionado a um aumento no risco de câncer cervical (39), embora em nosso estudo esta variável não apresentasse associação significativa.

No Estado do Rio Grande do Sul tem sido observado um aumento da mortalidade por câncer de colo uterino ao longo dos últimos 20 anos, em relação a outros estados da Região Sul do Brasil, em todas as faixas etárias, sendo maior o incremento anual na faixa de 50 a 64 anos (2, 40). Sendo o Rio Grande do Sul, o estado brasileiro onde é observada a prevalência de fumo mais elevada, seria possível especular que o fumo possa estar atuando como co-fator junto ao HPV e contribuindo assim para o aumento da morbidade e mortalidade por esta neoplasia em nosso meio. Se esta especulação estiver correta, é essencial que se combine junto às medidas de prevenção para a infecção genital pelo HPV, medidas para redução da exposição das mulheres ao fumo.

É possível que a existência de programas de educação e rastreamento sistemático de todas as mulheres após a primeira relação sexual possa modificar o quadro atual. Além disso, falhas na educação básica da população, a falta de conhecimento, a precariedade no sistema de saúde e a co-infecção com outras doenças sexualmente transmissíveis ainda estão relacionados aos altos índices de casos de câncer cervical. Desta forma, é necessária uma conscientização ainda maior por parte dos governos quanto ao processo de educação e informação para a saúde dos cidadãos.

Concluindo, este estudo aponta uma elevada prevalência de HPV, de CT e de co-infecção em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre. Esta informação pode

ser muito útil no desenvolvimento de vacinas para o HPV, na qualificação de programas de controle e prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e aplicação de medidas de prevenção em nível de atenção primária, as quais não exigem sofisticação tecnológica, podendo contribuir para uma redução deste importante problema em saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferenczy A, Franco E. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3(1):11-16.
2. Kalakun L, Bozzetti MC. Evolution of uterine cervical câncer mortality from 1979 to 1998 in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rio de Janeiro: Cad Saúde Pública Jan-Fev 2005;* 21(1):299-309.
3. Ministério da Saúde. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2004. Instituto Nacional do Câncer/Pró-Onco/Inca 2004. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 20 janeiro/2005.
4. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM *et al.* Epidemiology of aquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999 Nov; 180(5):1415-1423.
5. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995 Jun 7; 87(11):796-802.
6. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005 March; 32Suppl:S16-S24.

7. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human Papillomavirus and cervical cancer - burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31:3-13.
8. Vincelette J, Schirm J, Bogard M, Bourgault AM *et al.* Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 1999 Jan; 37(1):74-80.
9. Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM *et al.* *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. Gynecol Oncol 2005 Jan; 96(1):181-186.
10. Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M *et al.* Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2002 Aug; 43(4):277-281.
11. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. J Infect Dis 2002 Feb 1; 185(3):324-331.
12. Becker D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por Reação em Cadeia da Polimerase (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular 2005. P. 90.

13. Manhony JB, Coombes BK, Chernesky MA. *Chlamydia* and *Chlamydophila* In: Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003 P.991-1004.
14. Black MC. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Reviews. 1997; 1:160-184.
15. Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M. Epidemiologic and microbiology Correlates of *Chlamydia trachomatis* Infection in Sexual Partnerships. JAMA 1996 Dec 4; 276(21):1737-1742.
16. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) Censo 2000. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 dezembro/2004.
17. van Soolingen D, de Hass PEW, Hermans PWM *et al*. Isolation of genomic DNA from *Mycobacteria*. In: RFLP Analysis of *Mycobacteria*. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Beethoven, The Netherlands 1994. P.5-10.
18. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J. Use of PGMY *primers* in L1 consensus PCR improves detection of Human Papilomavirus DNA in genital samples. J Clin Microbiol 2002; 40(3):902-907.
19. Bauer HM, Ce Greer R, Mannos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR. In: Herrington CS, McGee JD editores. Diagnostic molecular pathology: a practical approach. England: Oxford University Press 1992. P. 224.

20. Ronco G. Use of molecular tests of human papillomavirus (HPV) as screening test for cervix cancer: a review. *Epidemiol Prev* 1999 Oct-Dec; 23(4):372-377.
21. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19(1-2):1-5.
22. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH *et al.* Determinants of genital papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20:274-278.
23. Gaydos C, Crotchfelt AK, Howell MR, Kralian S *et al.* Molecular amplification assays to detect Chlamydial infections in urine specimens from High School Female Students and monitor the persistence of Chlamydial DNA after therapy. *J Infect Dis* 1998 Feb; 177(2):417-424.
24. Griffais R, Thibon M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1989; 140(2):139-141.
25. Dillner J, Meijer CJ, Von Krogh G. Epidemiology of human papillomavirus infection. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205:194-200.
26. Nonnenmacher B, Pintos J, Bozzetti MC. Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. *Int J STD AIDS* 2003;14(4):258-265.

27. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O *et al.* Molecular variants of human papillomavirus humano tipos 16 e 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Med Virol* 2000; 58(81):2959-2968.
28. Ramos MC, Becker D, Germany C. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela Reação em cadeia da Polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. *J Bras DST* 2003; 15(2):12.
29. Jacyntho C, Almeida Filho G, Maldonado P. HPV: Infecção Genital Feminina e Masculina. São Paulo: Revinter 1994. P.127.
30. Santos C, Teixeira F, Vicente A. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(2):91-95.
31. de Lima Soares V, de Mesquita AM, Cavalcante FG, Silva ZP *et al.* Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health* 2003 Jul; 8(7):595-603.
32. Liaw KL, Glas AG, Manos MM, Greer CE. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999 Jun 2; 91(11):954-960.

33. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C. Population – based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:464-474.
34. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992;52(5):743-749.
35. Miranda AE, Szcwaecwald CL, Peres RL. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis* 2004; 31(9):542-546.
36. Zür Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;(186):131-156.
37. Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL. *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2000 Feb; 6(2):88-93.
38. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T *et al.* A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002 Oct 1; 101:371-374.
39. Brinton LA, Schairer C, Haenszel W, Stalley P *et al.* Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *JAMA* 1986 Jun 20; 255(23):3265-3269.

40. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis.

Virus Res 2002; 89(2):191-192.

Tabela 1. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de HPV e *Chlamydia trachomatis*.

Variáveis	HPV (+) (n=346)	HPV (-) (n=871)	<i>p</i> *	<i>Chlamydia</i> (+) (n=152)	<i>Chlamydia</i> (-) (n=1056)	<i>p</i> *
Grupos Etários (em anos) (n=1194)**						
≤ 34	120 (32,6%)	248 (67,4%)		58 (15,8%)	310 (84,2%)	0,04
≥ 35	226 (27,4%)	600 (72,6%)	0,07	94 (11,4%)	732 (88,6%)	
Cor (n=1194)**						
Branca	268 (27,5%)	706 (72,5%)		116 (11,9%)	858 (88,1%)	
Não Branca	78 (35,5%)	142 (64,5%)	0,02	36 (16,3%)	184 (83,7%)	0,09
Ocupação (n=1170)**						
Do Lar	89 (23,5%)	290 (76,5%)		39 (10,3%)	341 (89,7%)	
Assalariadas	79 (27,1%)	213 (72,9%)	0,001	30 (10,3%)	260 (89,7%)	0,02
Autônomas/Profissionais Liberais	172 (34,5%)	327 (65,5%)		78 (16,5%)	422 (84,4%)	
Escolaridade (n=1186)**						
Até 1º Grau Incompleto	93 (27,8%)	242 (72,2%)		41 (12,2%)	296 (87,8%)	
De 1º Grau Completo a 2º Grau Incompleto	108 (28,7%)	268 (71,3%)	0,80	44 (11,6%)	334 (88,4%)	0,49
≥ 2º Grau Completo	142 (29,9%)	333 (70,1%)		67 (14,2%)	404 (85,8%)	
Estado Marital (n=1194)**						
Com companheiro fixo	208 (26,5%)	577 (73,5%)		94 (12,0%)	692 (88,0%)	
Sem companheiro fixo	138 (33,7%)	271 (66,3%)	0,01	58 (14,2%)	350 (85,8%)	0,32
Fumo (n=1208)**						
Sim	95 (29,1%)	232 (70,9%)		40 (12,2%)	287 (87,8%)	
Não	251 (28,5%)	630 (71,5%)	0,83	112 (12,7%)	769 (87,3%)	0,89
Sexarca (em anos) (n=1194)**						
< 20	228 (28,7%)	567 (71,3%)		118 (14,8%)	678 (85,2%)	
≥ 20	118 (29,6%)	281 (70,4%)	0,80	34 (8,5%)	365 (91,5%)	0,003
Parceiros Sexuais na Vida (n=1194)**						
≤ 3	226 (26,8%)	616 (73,2%)		98 (11,6%)	746 (88,4%)	
> 3	120 (34,1%)	232 (65,9%)	0,01	54 (15,4%)	296 (84,6%)	0,09

Tabela 1. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de HPV e *Chlamydia trachomatis* (Continuação).

Variáveis	HPV (+) (n=346)	HPV (-) (n=871)	<i>p</i> *	<i>Chlamydia</i> (+) (n=152)	<i>Chlamydia</i> (-) (n=1056)	<i>p</i> *
<i>Paridade (n=1208)**</i>						
≤ 2 filhos	211 (28,6%)	526 (71,4%)		91 (12,4%)	645 (87,6%)	
> 2 filhos	135 (28,7%)	336 (71,3%)	0,92	61 (13,0%)	411 (87,0%)	0,83
<i>Uso de Anticoncepcional Oral (n=1114)**</i>						
Sim	299 (28,7%)	742 (71,3%)		131 (12,6%)	911 (87,4%)	
Não	24 (32,9%)	49 (67,1%)	0,53	8 (11,0%)	64 (89,0%)	0,83
<i>História de Condiloma Genital (n=1197)**</i>						
Sim	42 (33,3%)	84 (66,7%)		19 (15,1%)	107 (84,9%)	
Não	299 (27,9%)	772 (72,1%)	0,24	133 (12,4%)	938 (87,6%)	0,50
<i>História de Clamídia Genital (n=1181)**</i>						
Sim	27 (39,7%)	41 (60,3%)		13 (19,1%)	55 (80,9%)	
Não	309 (27,8%)	804 (72,2%)	0,04	137 (12,3%)	976 (87,7%)	0,15
<i>História de Condiloma Genital no Parceiro (n=958)**</i>						
Sim	18 (48,6%)	19 (51,4%)		7 (18,4%)	31 (81,6%)	
Não	245 (26,6%)	676 (73,4%)	0,006	110 (12,0%)	810 (88,0%)	0,30

* Valores de *p* para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer;

** Os números utilizados (n) para a análise são apresentados em cada variável. Esta diferença observada é explicada em decorrência do número de dados ignorados em cada variável. A diferença de 9 mulheres observada entre o grupo total testado para HPV e CT corresponde a participantes do estudo que realizaram o teste para HPV, porém não para CT (material insuficiente para o teste da CT).

Tabela 2. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de Co-Infecção por HPV e CT.

Variáveis	Co-Infecção (+)** (n=78)	Co-Infecção (-)** (n=769)	p*
Grupos Etários (em anos) (n=847)***			
≤ 34	28 (11,5%)	216 (88,5%)	
≥ 35	50 (8,3%)	553 (91,7%)	0,18
Cor (n=847)***			
Branca	58 (8,3%)	643 (91,7%)	
Não Branca	20 (13,7%)	126 (86,3%)	0,05
Ocupação (n=834)***			
Do Lar	22 (7,5%)	271 (92,5%)	
Assalariadas	16 (7,5%)	196 (92,5%)	
Autônomas/Profissionais Liberais	40 (12,2%)	289 (87,8%)	0,08
Escolaridade (n=842)***			
Até 1º Grau Incompleto	18 (7,7%)	217 (92,3%)	
De 1º Grau Completo a 2º Grau Incompleto	30 (10,6%)	253 (89,4%)	
≥ 2º Grau Completo	30 (9,3%)	294 (90,7%)	0,52
Estado Marital (n=847)***			
Com companheiro fixo	52 (8,9%)	532 (91,1%)	
Sem companheiro fixo	26 (9,9%)	237 (90,1%)	0,74
Fumo (n=847)***			
Sim	19 (8,3%)	203 (91,3%)	
Não	59 (9,4%)	566 (90,6%)	0,75
Sexarca (em anos) (n=847)***			
< 20	56 (10,1%)	500 (89,9%)	
≥ 20	22 (7,6%)	269 (92,4%)	0,28
Parceiros Sexuais na Vida (n=847)***			
≤ 3	49 (8,0%)	564 (92,0%)	
> 3	29 (12,4%)	205 (87,6%)	0,06

Tabela 2. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de Co-Infecção por HPV e CT (*Continuação*).

Variáveis	Co-Infecção (+)** (n=78)	Co-Infecção (-)** (n=769)	p*
Paridade (n=859)***			
≤ 2 filhos	52 (9,7%)	483 (90,3%)	
> 2 filhos	26 (8,0%)	298 (92,0%)	0,47
Uso de Anticoncepcional Oral (n=792)***			
Sim	68 (9,2%)	675 (90,8%)	
Não	4 (8,2%)	45 (91,8%)	0,81
História de Condiloma Genital (n=845)***			
Sim	9 (10,7%)	75 (89,3%)	
Não	69 (9,1%)	692 (90,9%)	0,76
História de Clamídia Genital (n=834)***			
Sim	8 (18,2%)	36 (81,8%)	
Não	69 (8,7%)	721 (91,3%)	0,05
História de Condiloma Genital no Parceiro (n=683)***			
Sim	4 (19,0%)	17 (81,0%)	
Não	56 (8,5%)	606 (91,5%)	0,10

* Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer;

** Para análise da co-infecção, foram consideradas o grupo positivo as mulheres que apresentaram resultado positivo para HPV e CT, e grupo negativo as mulheres sem nenhum tipo de infecção. Assim a amostra total para esta análise foi de n=847 mulheres (78 positivas e 769 negativas).

*** Os números utilizados (n) para a análise são apresentados em cada variável. Esta diferença observada é explicada em decorrência do número de dados ignorados em cada variável.

Tabela 3. Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com a presença de HPV, CT e Co-Infecção.

Variáveis	HPV (+)	HPV (-)	P*	Chlamydia (+)	Chlamydia (-)	P*	Co-Infecção*** (+)	Co-Infecção*** (-)	P*
Exame Citopatológico (n=993)**									
Normal (n=905)	250 (27,7%)	655 (72,3%)		120 (13,3%)	785 (86,7%)		57 (8,8%)	588 (91,2%)	
Lesão de Baixo Grau (n=85)	57 (67,1%)	28 (32,9%)	<0,001	11 (12,9%)	74 (87,1%)	0,79	10 (27,0%)	27 (73,0%)	0,001
Lesão de Alto Grau (n=3)	2 (66,7%)	1 (33,3%)		0 (0,0%)	3 (100,0%)		0 (0,0%)	1 (100,0%)	
Exame Colposcópico (n=185)	N=159	N=26		N=36	N=149		N=36	N=26	
Normal (n=137)	117 (85,4%)	20 (14,6%)		23 (16,9%)	114 (83,1%)		23 (53,5%)	20 (46,5%)	
Anormal (n=48)	42 (87,5%)	6 (12,5%)	0,81	13 (27,1%)	35 (72,9%)	0,19	13 (68,4%)	6 (31,6%)	0,41
Exame Anatomopatológico (n=50)	N=43	N=7		N=10	N=40		N=10	N=7	
Normal (n=16)	12 (75,0%)	4 (25,0%)		2 (12,5%)	14 (87,5%)		2 (33,3%)	4 (66,7%)	
Baixo Grau (n=30)	27 (90,0%)	3 (10,0%)	0,55	7 (23,3%)	23 (76,7%)	0,66	7 (70,0%)	3 (30,0%)	0,24
Alto Grau (n=4)	4 (100,0%)	0 (0,0%)		1 (25,0%)	3 (75,0%)		1 (100,0%)	0 (0,0%)	

Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer;

** N amostral para HPV e CT = 993;

*** N amostral para co-infecção por HPV e CT = 683 (foram excluídas da análise as mulheres com mono-infecção); dentro do grupo co-infecção, 62 pacientes fizeram colposcopia, tendo 43 pacientes com resultado normal e 19 pacientes com resultado anormal; 17 pacientes realizaram exame anatomopatológico, tendo 6 pacientes com resultado normal, 10 com resultado para baixo grau e 1 com resultado para alto grau.

Tabela 4. Razões de Chance Ajustadas* e IC 95% da Associação Entre as Variáveis Estudadas e a Presença de HPV, *Chlamydia trachomatis*, e Co-Infecção.

Variáveis	HPV	<i>Chlamydia</i>	Co-Infecção
	RC(IC95%)*	RC (IC95%)*	RC(IC95%)*
Grupo Etário (em anos)			
≤ 34	1,27 (0,90-1,80)	1,17 (0,74-1,85)	1,39 (0,75-2,58)
≥ 35 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Cor			
Branca (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Não Branca	1,60 (1,10-2,38)	1,29 (0,76-2,20)	1,67 (0,84-3,35)
Ocupação**			
Do Lar	1,52 (1,05-2,21)	1,79 (1,04-3,07)	1,99 (0,99-3,95)
Assalariadas	1,74 (1,17-2,60)	1,93 (1,15-3,25)	2,02 (0,98-4,20)
Autônomas/Profissionais Liberais	1,0	1,0	1,0
Estado Marital			
Com Companheiro Fixo (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Sem Companheiro Fixo	1,29 (0,90-1,87)	1,03 (0,63-1,69)	1,11 (0,55-2,24)
Fumo			
Sim	1,21 (0,85-1,73)	1,15 (0,71-1,87)	1,06 (0,55-2,01)
Não (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Sexarca			
< 20	1,03 (0,71-1,48)	1,82 (1,05-3,15)	1,23 (0,60-2,51)
≥20 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Parceiros Sexuais na Vida			
≤ 3 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
> 3	1,17 (0,81-1,71)	1,45 (0,93-2,30)	2,02 (1,12-3,65)
Uso de Anticoncepcional Oral			
Sim	1,04 (0,55-1,94)	1,20 (0,54-2,68)	1,19 (0,40-3,59)
Não (Ref.)	1,0	1,0	1,0
História de Clamídia Genital			
Sim	1,84 (0,99-3,41)	1,19 (0,50-2,81)	1,75 (0,60-5,10)
Não (Ref.)	1,0	1,0	1,0
História de Condiloma Genital no Parceiro			
Sim	2,35 (1,17-4,72)	1,48 (0,59-3,73)	2,16 (0,59-7,95)
Não (Ref.)	1,0	1,0	1,0

Razão de Chance (RC); Intervalo de Confiança para a RC de 95% (IC95%);

* RC ajustadas para todas as variáveis da tabela.

Tabela 5. Comparação das variáveis do estudo atual com achados de outros estudos.

Variável	Nosso Estudo	Achados de Outros Estudos*
<i>Parceiros Sexuais na Vida</i>	+/- (Co-Infecção)	+
<i>Sexarca</i>	+/- (CT)	+
<i>Fumo</i>	-	+/-
<i>Sem Companheiro Fixo</i>	-	+/-
<i>Escolaridade</i>	-	+
<i>Cor Não Branca</i>	+/- (HPV)	+/-
<i>História de Condiloma no Parceiro</i>	+/- (HPV)	+/-

* Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002 Feb 1; 185(3):324-331.

* Brinton LA, Schairer C, Haenszel W, Stalley P et al. Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *JAMA* 1986 Jun 20; 255(23):3265-3269.

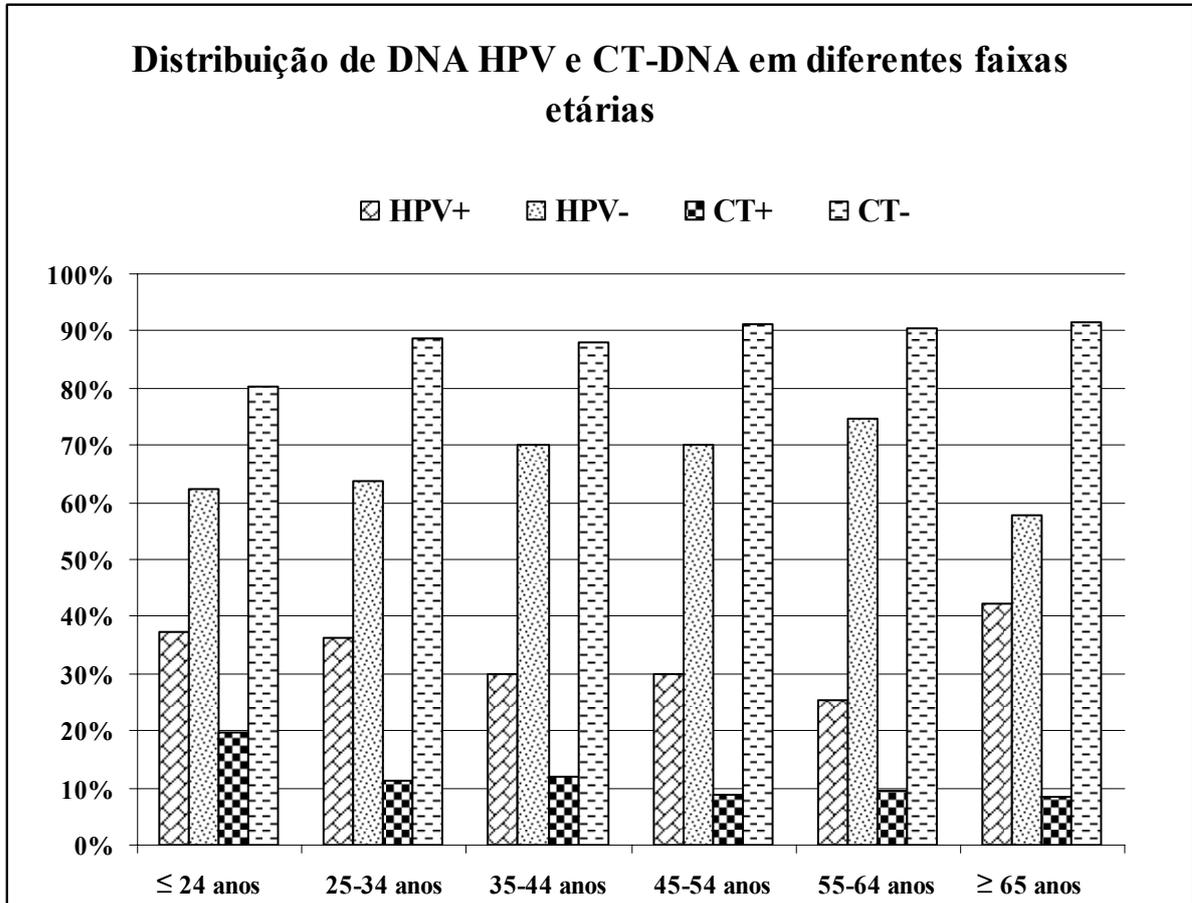
* Chan PKS, Chang AR, Cheung JOLK, et al. Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection: Differences between High- and Low- Oncogenic Risk Types. *J Infect Dis* 2002;185:28-35.

* Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Oct;13(10):1574-1582.

* Hankins C, Coullée F, Lapointe N, Simard P et al. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *CMAJ* 1999 26 jan; 160(2):185-191.

* Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC et al. Predictors of Cervical Co-Infection with Multiple Human Papillomavirus Types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Oct; 12(10): 1209-1037.

Figura 1. Distribuição de Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em diferentes faixas etárias.



ANEXO I

OBJETIVOS DO ESTUDO MÃE "DISTRIBUIÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO ONCOGÊNICOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM LESÕES DO COLO UTERINO"

- Verificar a distribuição da infecção por HPV oncogênicos (em especial 16 e 18) em mulheres no nosso meio de acordo com a faixa etária.
- Descrever a soroprevalência dos HPVs 16 e 18 nesta população de acordo com a faixa etária.
- Verificar a associação desta infecção com alterações citológicas diagnosticadas por colposcopia e biópsia nestas mulheres.
- Verificar a presença de variações dos HPVs de sub-tipo 16 e 18 na população estudada e sua relação com o desenvolvimento de lesão cervical.

Os objetivos acima descritos pretendem auxiliar na resposta às seguintes questões:

Qual a frequência de infecção genital por HPVs oncogênicos em mulheres do nosso meio e como esta frequência se distribui por faixa etária?

Quais os fatores associados a esta distribuição (culturais, imunológicos, ou outros)?

Que fatores estão associados ao estado de portador de HPV? Quais fatores de risco para desenvolver a doença são mais observados em nosso meio e qual a importância destes fatores na infecção pelo vírus e na transformação maligna destas lesões?

Nossa expectativa é contribuir para a compreensão do valor desta associação para se distinguir as mulheres que evoluirão para lesões de alto grau ou neoplasia francamente invasiva.

ANEXO II

O presente estudo foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Reguladoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde) e submetido ao comitê de Ética Médica das Instituições Participantes.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO
CEP - GHC
RESOLUÇÃO

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.

O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

Nº 112/2002

Título: A distribuição de papilomavirus humanos oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical.

Pesquisador (es): Mary Clarisse Bozzetti

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento livre e Esclarecido, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer **APROVADO**. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.



Dr. Mário Roberto Silveira
Coordenador
Comitê de Ética do GHC

ANEXO III

FICHA DE COLETA DE DADOS – QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

I. QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST _ _ _

--

1. Nome: _____

2. Endereço: _____

3. Telefone de contato: _____

4. Data de nascimento? ___ / ___ / _____ (dd/mm/aaaa)

DNASC: ___ / ___ / _____

5. Data da entrevista? ___ / ___ / _____ (dd/mm/aaaa)

DENT: ___ / ___ / _____

6. Idade: __ (em anos)

IDADE: __

7. Estado marital:

ESTMARIT: _

(1) Casada ou com companheiro fixo há pelo menos 1 ano

(2) Com companheiro há menos de 1 ano (3) Solteira

(4) Divorciada/desquitada (5) Separada

(6) Viúva

8. Ocupação: _____ OCUP: __

9. Cor da pele:

(1) branca (2) negra (3) mulata (4) amarela

COR: _

10. Escolaridade:

ESCOLAR: _

(1) analfabeta (2) primeiro grau incompleto

(3) primeiro grau completo (4) segundo grau incompleto

(5) segundo grau completo (6) terceiro grau incompleto

(7) terceiro grau completo (9) ignorado

11. Número de pessoas que residem na casa: __

PCASA: __

12. Renda da família (anotar a renda em reais) _____ RENDA: __

13. Você fuma? (1) Sim (2) Não

FUMO: _

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 13 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 16

- | | |
|--|-------------|
| 14. Se sim, há quanto tempo? __ (em anos) | TFUMO: __ |
| 15. Se sim, quantos cigarros fuma por dia? __ | CIGDIA: __ |
| 16. Idade da primeira menstruação: __ | MENARCA: __ |
| 17. Seus ciclos menstruais são regulares? _____(intervalo) | CMENST: _ |
| 18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não | MENOP1: _ |

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 18 FOR “SIM” PULE PARA A QUESTÃO 22

- | | |
|---|-------------|
| 19. Se não, há quanto tempo? __ (em anos) | MENOP2: __ |
| 20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal?
(1) Sim (2) Não | MENOP3: _ |
| 21. Se sim, por quanto tempo? __ (em anos) | MENOP4: __ |
| 22. Qual a idade da primeira relação sexual: __ | SEXARCA: __ |
| 23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: __ | PARSEX1: __ |
| 24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: __ | PARSEX2: __ |
| 25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional?
(1) Sim (2) Não | ACO1: _ |
| 26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou?
(1) Anticoncepcional oral; (2) Anticoncepcional injetável;
(2) Condon (camisinha); (4) Diagrama;
(5) “Camisinha” feminina; (6) DIU/Mirena;
(7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;
(10) Não se aplica; (11) Outro: _____ | ACO2: __ |
| 27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não | GESTA1: _ |

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 27 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 33

- | | |
|--|-------------|
| 28. Se sim, quantas vezes? __ | GESTA2: __ |
| 29. Que idade tinha na primeira gestação? | GESTA3: __ |
| 30. Quantos filhos nasceram vivos? | FVIVOS: __ |
| 31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não | ABO1: _ |
| 32. Se sim, quantos? __ | ABO2: __ |
| 33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças?
(1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe | |
| Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _ | COND: _ |
| AIDS/ HIV positiva: _ | HIV: _ |
| Sífilis: _ | SIFILIS: _ |
| Gonorréia: _ | GONO: _ |
| Candidíase genital: _ | CANDIDA: _ |
| Clamídia genital: _ | CLAMIDIA: _ |
| Herpes genital: _ | HERPES: _ |

Outra, qual?: _____
 34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? OUTDST: _
 35. Se sim, qual? _____ TRAT1: _
 36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes TRAT2: _
 doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe
 Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _ CONDM: _
 AIDS/ HIV positivo: _ HIVM: _
 Sífilis: _ SIFILISM: _
 Gonorréia: _ GONOM: _
 Candidíase genital: _ CANDIDAM: _
 Clamídia genital: _ CLAMIDIAM: _
 Herpes genital: _ HERPESM: _
 Outra, qual?: _____ OUTDSTM: _
 37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? TRATM1: _
 38. Se sim, qual? _____ TRATM2: _
 39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de CP1: _
 colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe
 40. Se sim, qual a data do último exame? ___ / ___ (mm/aaaa) DATCP: _ _ / _ _ _
 41. Você costuma realizar auto-exame de mamas? MAMA1: _
 (1) Sim (2) Não
 42. Se sim, com que frequência? MAMA2: _
 (1) diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: _____
 43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde?
 (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
 Doença cardiovascular (HAS, DIC): _ HDCV: _
 Lesões pré-invasivas de colo de útero: _ HLPCU: _
 Doença endócrino-metabólica (diabetes): _ HDEM: _
 Doença Respiratória (asma, dpoc): _ HDR: _
 Doença psiquiátrica (depressão): _ HDP: _
 Câncer ginecológico: _ HCAG: _
 Outro tipo de câncer: _ HC: _
 44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o TRATPS1: _
 seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não
 45. Se sim, qual o tratamento? _____ TRATPS2: _ _

 46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou
 teve algum dos seguintes problemas de saúde?
 (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
 Doença cardiovascular (HAS, DIC): _ HFDCV: _
 Lesões pré-invasivas de colo de útero: _ HFLPCU: _
 Doença endócrino-metabólica (diabetes): _ HFDEM: _
 Doença Respiratória (asma, dpoc): _ HFDR: _
 Doença psiquiátrica (depressão): _ HFDP: _
 Câncer ginecológico: _ HFCAG: _
 Outro tipo de câncer: _ HFC: _
 AIDS(HIV positivo): _ HFAIDS: _
 47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o TRATPSF1: _
 este problema de saúde? (1) Sim (2) Não

48. Se sim, qual o tratamento? _____

TRATPSF2: _ _

49. História de óbito na família nos últimos cinco anos?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe

ÓBITOF: _

50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: _ _ (anos)

OBFIDAD: _ _

51. Se sim, qual a causa da morte? _____

CAUSAOBF: _ _

OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR:

.....

.....

.....

.....

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

II. QUESTIONÁRIO DE DADOS DO EXAME E COLETA DE MATERIAL

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST _ _ _ _ _

1. Nome: _____

2. Foram realizados os seguintes exames na participante do estudo:

Coleta para exame cito - patológico da cérvix uterina (CP):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado do CP?

CP: _ _

(1) Normal; (2) AGUS; (3) ASCUS

(4) NIC 1; (5) NIC 2; (6) NIC 3;

(7) Ca in situ; (8) Ca invasivo; (9) Outro: _____

Coleta de material para PCR (PCR):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da PCR (HPV-DNA)?

HPVDNA: _

(1) Positiva (2) Negativa

Se positiva, qual o tipo de HPV identificado? _____ THPV: _

Coleta de sangue para a sorologia p/HPV(SORO):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da sorologia para o HPV?

SOROHPV: _

(1) Positiva (2) Negativa

Foi indicado colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não

Foi realizada colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não, porque?

Resultados da colposcopia?

COLPO: _

(1) Anormal com realização de biópsia;

(2) Anormal sem realização de biópsia (porque? _____)

(3) Normal

ANEXO IV

TERMO DE CONSETIMENTO INFORMADO

Título do Projeto: A Distribuição de Papilomavírus Oncogênicos e Sua Associação Com Lesões do Colo Uterino

Protocolo nº: _____

Financiamento: CAPES-PROF (UFRGS); FIPE/HCPA; FAPERGS; LACEN/RS

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. É causada pelo vírus conhecido como Papilomavírus Humano ou HPV. Este vírus é o principal agente causador do câncer de colo de útero. Pelo fato deste ser um câncer bastante comum entre as mulheres em nosso meio e, embora possa ser diagnosticado precocemente e as mulheres curadas, ele ainda é responsável por um grande número de mortes entre as mulheres em nosso meio. Por isso, a busca de métodos para um diagnóstico mais precoce e mais acessível à toda população têm sido tema de muitas pesquisas.

Nós planejamos um estudo que tem como principal enfoque a identificação e o acompanhamento de mulheres portadoras do HPV bem como de outras lesões associadas presentes no colo uterino. Por isso estamos convidando-a a fazer parte deste estudo, cujos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios estão descritos a seguir.

Objetivos do estudo:

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV

ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

Procedimentos:

As mulheres que concordarem em participar do estudo serão inicialmente entrevistadas para responder algumas questões relacionadas à sua saúde, após será realizado um exame ginecológico no qual será coletado, através do uso de uma escova especial para este exame, material da parte externa e do canal do colo uterino. Deste material será realizado exame citológico, (preventivo do câncer de colo de útero) e material para investigar a presença do HPV.

As mulheres que tiverem o exame citológico alterado e/ou que tiverem a presença do HPV ao exame serão encaminhadas para a realização de uma colposcopia, que um exame semelhante ao exame ginecológico, onde se observa o colo do útero com lente de aumento. Se neste exame for constatada a presença de alguma lesão no colo do útero, será realizada uma biópsia desta lesão, que significa retirar um pequeno fragmento da lesão e encaminhar para um exame mais minucioso, chamado exame histopatológico e também, neste mesmo fragmento será estudado se existe alguma alteração na proteína P16.

Também será coletado nas mulheres que concordarem em participar do estudo, 20 ml de sangue. Deste sangue será isolado o soro, que será congelado e posteriormente será feita a verificação da presença do HPV.

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas poderá ser no mínimo semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

Riscos e Desconfortos:

Os riscos e desconfortos às participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima, ou seja, a coleta de material para o exame citológico e para o HPV poderá de modo pouco freqüente, causar um pequeno sangramento local, que cessará espontaneamente. Para as mulheres que necessitarem a realização de biópsia, poderá também

ocorrer um pequeno sangramento com melhora espontânea e eventualmente poderá haver um pouco de dor local, também passageira. A coleta de sangue é de uma quantidade pequena (20 ml) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos às participantes do estudo.

Benefícios:

Os benefícios diretos do estudo às participantes serão: estas terão a oportunidade de serem identificadas com lesões pré-cancerosas do colo de útero e tratadas antes da evolução destas lesões; aquelas que forem positivas a algum tipo de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino e que não tiverem lesões aparentes serão acompanhadas com uma frequência maior visando acompanhar e tratar as possíveis lesões que se desenvolverem.

Como benefício indireto estas mulheres estarão contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução (prognóstico) para o conhecimento científico, já que está é uma doença altamente prevenível e curável se detectada precocemente e que, no entanto ainda está entre as causas de morte por câncer mais comum entre as mulheres, especialmente em nosso meio.

Compensação financeira:

Não haverá nenhum pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo, bem como as participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

Confidencialidade:

Toda a informação que será fornecida pelas participantes do estudo e os resultados advindos dos procedimentos realizados serão considerados confidenciais e será somente conhecida da equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única

identificação utilizada no banco de dados do estudo que será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas serão esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Mary Clarisse Bozzetti em qualquer momento do estudo pelo telefone 3333 8779.

Em caso de danos:

Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo ou se tem alguma pergunta sobre os cuidados médicos que necessita esta deverá contatar a coordenadora do estudo Dra. Mary Clarisse Bozzetti pelo seguinte telefone: 33338779.

Se houver algum dano à sua saúde resultante de sua participação, receberá os cuidados médicos necessários sem custos adicionais. Não haverá, no entanto, compensação financeira, apenas atendimento médico e hospitalar quando indicado.

Participação voluntária:

A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

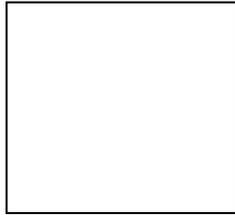
Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia durante o decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

O Significado de Sua Assinatura:

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo.

VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

Carimbo do estudo



Assinatura da paciente e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data:

Assinatura do coordenador do estudo Data:

Coordenadora

Dr^a Mary Clarisse Bozzetti

Rua Ramiro Barcelos 2600, 4º andar Sala 417 D

Bairro Santana, Porto Alegre CEP 90035-003

Fone: 51-33301380

Responsável pelo Projeto

Cristine Nascente Igansi

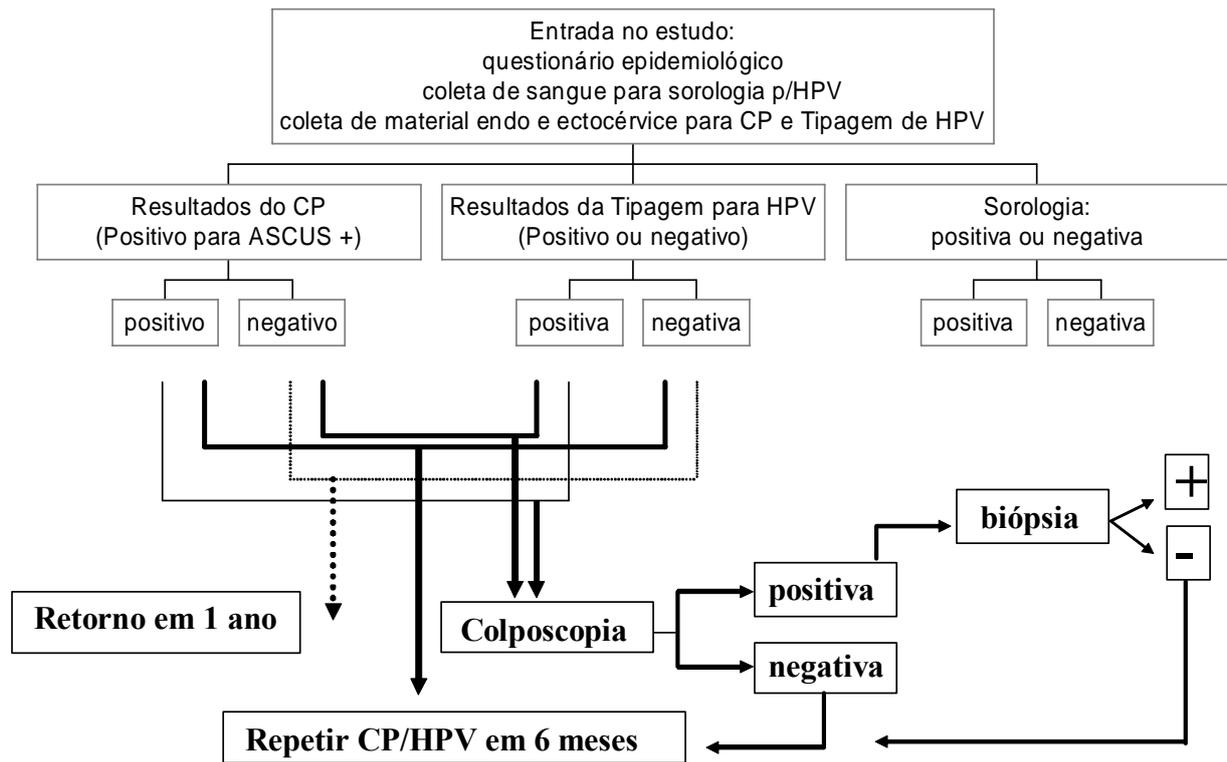
Residencial Vila Aços Finos Piratini, Núcleo D-67 casa 675

Charqueadas CEP 96745-000

Fone: 51-84117004

ANEXO V

Fluxograma de seguimento das participantes do estudo



ANEXO VI

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS E ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO, DECORRENTES DO PRESENTE ESTUDO.

6º Congresso Brasileiro de Medicina de Família & Comunidade e 6º Congresso de Medicina Familiar, Região Conesul CIMF/WONCA, Rio de Janeiro, Brasil - de 3 a 6 de abril 2004. *Co-infecções Cérvico-Vaginais por Chlamydia trachomatis e Papilomavírus Humano: Resultados Preliminares de um Estudo de Coorte.*

VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia Recife, PE, Brasil - de 19 a 23 de junho de 2004. *Co-infecções Cérvico-Vaginais por Chlamydia trachomatis e Papilomavírus Humano: Resultados Preliminares de um Estudo de Coorte.*

38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial Exposição Técnico-Científica, Florianópolis, SC, Brasil - de 22 a 25 de setembro de 2004. *Co-infecções Cérvico-Vaginais por Chlamydia trachomatis e Papilomavírus Humano: Resultados Preliminares de um Estudo de Coorte.*

V Salão de Iniciação Científica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Porto Alegre, Brasil - de 27 a 29 de outubro de 2004. *Comparação da Detecção de DNA do Papilomavírus Humano (HPV) por PCR, através de Primes Consenso e Específicos para HPV-16 em amostras cervicais.*

XIII Salão de Iniciação Científica, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa, Porto Alegre, Brasil, 2004. ***Padronização e Comparação da Detecção de DNA HPV por PCR através da utilização de primers consenso em amostras cervicais.***

2º Congresso de Infectologia do Conesul. De 02 a 04 de dezembro de 2004. Centro de Convenções Rebouças, São Paulo – Brasil. ***Incidência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres do Serviço de Atenção Primária do Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Porto Alegre – Brasil: Resultados Preliminares de um Estudo de Coorte*** (Revista Pan-Americana de Infectologia).

22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Vancouver B.C. Canada. April 30 – May 6, 2005. ***P16INK4A Expression and Human Papillomavirus Infection in Cervical Intraepithelial Lesions and Epidemiological Aspects.***

22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Vancouver B.C. Canada. April 30 – May 6, 2005. ***Oncogenic Human Papillomavirus, associated factors and cervical lesions: an epidemiological study from Southern Brazil.***

ANEXO VII

PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA

PROJETO DE MESTRADO

PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E *Chlamydia trachomatis* (CT) EM UMA AMOSTRA DE MULHERES ASSINTOMÁTICAS DE PORTO ALEGRE, BRASIL: PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS

CRISTINE NASCENTE IGANSI

ORIENTADORA: Dr.^a. MARY CLARISSE BOZZETTI

PORTO ALEGRE, ABRIL 2004

INTRODUÇÃO

O câncer cervical acomete anualmente cerca de 470.000 mulheres em todo o mundo (1). No Brasil, são diagnosticados mais de 16.000 casos ao ano de câncer cervical, sendo que 10 mulheres morrem por dia devido a esta enfermidade (2, 3).

O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação aos tipos oncogênicos de Papilomavírus Humanos (HPV) está bem documentada, sendo este um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical.

Segundo de Lima Soares V *et al.*, 2003, estudo realizado em Alagoas, Brasil, 341 mulheres arroladas, 6,4% apresentavam resultados confirmatório para infecção por *Chlamydia trachomatis* e 26,6% resultado positivo para infecção por Papilomavírus Humano (4).

A infecção genital por *Chlamydia trachomatis* é estudada como um co-fator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV, resultando também em cervicites mucopurulentas crônicas, uretrites, doença inflamatória pélvica (DIP) (18,0% a 24,0%) e endometriose (6,0% a 21,0%) (5, 6).

A estimativa da prevalência das infecções por HPV entre mulheres no mundo varia de 2,0% a 44,0%, diferença esta explicada por diferenças nas faixas etárias das populações estudadas e pela sensibilidade dos métodos diagnósticos utilizados para a detecção da infecção.

Segundo Kulasingam *et al.*, 2002, a prevalência de infecções por HPV de alto risco em uma população dos Estados Unidos com idade de 25 anos foi de 27,4%. Entretanto, um recente estudo na Escócia com mulheres de idade de 36 anos demonstrou uma prevalência de aproximadamente 20,5% para todos os tipos de HPV e 15,7% para HPV de alto risco (7).

Mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 20 anos são as mais acometidas pela infecção por clamídia, sendo a prevalência observada em torno de 10,0%, no entanto, em clínicas de DST, estes índices podem atingir 40,0%.

As diferenças anatômicas na cérvix uterina, entre as mulheres, podem favorecer uma maior ou menor exposição ao agente etiológico. Além disso, há outras variáveis sabidamente associadas à infecção por CT e HPV, como nuliparidade, ser solteira, raça negra e baixa condição sócio-econômica, bem como a não utilização de preservativos nas relações sexuais e infecções gonocócicas concomitantes (8, 9).

Na tentativa de conhecer a prevalência de infecções genitais por HPV e *Chlamydia trachomatis* em uma amostra de mulheres assintomáticas de uma área geográfica da zona norte de Porto Alegre e, de verificar a associação destas infecções com os fatores estudados, em especial com a presença de lesões cervicais, planejou-se este estudo. Espera-se que os achados possam contribuir para uma melhor compreensão dos importantes problemas de saúde pública relacionados às Doenças Sexualmente Transmissíveis e às causas de morbidade e mortalidade do câncer cervical em nosso meio, já que esta é uma neoplasia com elevado potencial de prevenção e de cura se detectado precocemente.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO

As taxas de aquisição de infecções por papilomavírus humano (HPV) são elevadas, principalmente em adultos jovens sexualmente ativos (10).

O HPV-16 é um dos tipos de alto risco mais comum entre mulheres, e também o subtipo mais freqüente entre os casos de câncer cervical, com taxas entre 24,3% em mulheres com idade média de 16 anos e 23,7% em mulheres com 25 anos (11, 12, 13, 14, 15). O subtipo HPV-18, também classificado como de alto risco, apresenta taxas de prevalência de 7,3% em mulheres com idade de 16 anos e 7,2% em mulheres com idade de 25 anos.

Nos Estados Unidos, entre 1966 e 1984, ocorreu um acréscimo de 450,0% no número de casos de verrugas anogenitais (10). Em um estudo realizado com soro de mulheres grávidas na Finlândia, foi verificado um acréscimo na prevalência de infecções por HPV-16 de 17,0% em 1983 a 1985 para 24,0% em 1995 a 1997, com idade entre 23 a 31 anos (16). Na Alemanha, a prevalência de infecções por HPV-16 teve um acréscimo de 16,0% para 21,0% entre 1969 e 1980 (17).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis é uma bactéria intracelular, gram-negativa, obrigatória e sexualmente transmissível, que infecta células epiteliais humanas do trato genital e ocular, sendo, portanto, responsável por uma vasta variedade de desordens celulares, incluindo lesões cervicais (18).

Infecções por *Chlamydia trachomatis* apresenta altas taxas de prevalência no mundo e geralmente são assintomáticas, representando de 70,0% a 80,0% dos casos e frequentemente não é detectada (19).

A infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis* é um grande problema de saúde pública, sendo considerado a maior causa de morbidade em indivíduos sexualmente ativos, com uma estimativa de 89 milhões de novos casos ocorrendo anualmente em todo o mundo, sendo que indivíduos não tratados servem como reservatório para a transmissão da infecção aos parceiros sexuais (20, 21).

No Brasil, a infecção genital por clamídia não é uma doença de notificação compulsória. Alguns estudos de prevalência vêm sendo conduzidos isoladamente em populações específicas, utilizando-se testes moleculares para a detecção de *Chlamydia trachomatis*, os quais permitem a realização de triagens populacionais. Ramos e colaboradores (2003) realizaram um estudo de base populacional em mulheres residentes em uma vila popular da cidade de Porto Alegre (RS), que revelou uma baixa prevalência, da ordem de 0,59% (22). O mesmo grupo, no entanto, pesquisando 79 pacientes masculinos de uma clínica de DST, obteve positividade para *Chlamydia trachomatis* em 41,9% dos casos (23).

Na Colômbia e Filipinas há poucos estudos de co-infecções de Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* (24). Na Índia, as DST e cânceres anogenitais são um dos maiores problemas de saúde pública em mulheres. Anualmente, aproximadamente 100.000 mulheres desenvolvem câncer cervical e 40,0% a 50,0% são infectadas com uma ou outra doença sexualmente transmissível (19). Em mulheres assintomáticas, cerca de 30,0% a 81,0% apresentaram resultados positivos em sorologia para *Chlamydia trachomatis* (19).

Recentes estudos epidemiológicos, baseados na detecção de *Chlamydia trachomatis* a partir de tipos específicos de anticorpos no soro sanguíneo, têm demonstrado que a infecção

por esta bactéria aumenta o risco de câncer cervical invasivo entre mulheres HPV positivas, embora a prevalência seja geralmente baixa (3,0% a 22,0%) (6, 18, 25).

1.3. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e são classificados de acordo com seu potencial oncogênico e pela variabilidade na seqüência do gene L1. O HPV é considerado como de baixo risco (subtipos -6, -11, -26, -42, -43, -44, -54, -70, -73) e alto risco (subtipos -16, -18, -31, -33, -45, -56, -58, -59, -66, -68) (26).

Atualmente, são conhecidos mais de 230 subtipos diferentes que atingem a população e que afetam também outros vertebrados, como por exemplo, cães, coelhos, papagaios, ruminantes e baleias (27). Em geral, HPV de baixo risco estão relacionados com tumores benignos e lesões cutâneas leves, enquanto que, HPV de alto risco estão diretamente associados com neoplasias intraepiteliais que podem progredir para carcinomas anogenitais (28). A vasta diversidade de câncer cervical está associada à infecção com os subtipos de alto risco de HPV. O subtipo HPV-16 é o mais prevalente subtipo mucoso de alto risco, seguido pelo HPV-18, HPV-31, e outros.

1.4. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV

1.4.1. Organização Genômica do Vírus

A característica mais específica do HPV é que na maioria dos tumores benignos, o genoma viral é preservado como DNA episossomal (não integrado ao genoma hospedeiro).

O vírus tem aproximadamente 55 nm de diâmetro e possui um capsídeo icosaedral de 72 capsômeros que contém o DNA viral, dupla fita e circular, com aproximadamente 8.000 pares de bases (pb), e compreende três regiões, conhecidas como região precoce (*early region*) de aproximadamente 4 kb, região tardia (*late region*), com 3 kb e a região controladora (*Long Control Region*), com 1 kb (29, 30).

Somente uma das fitas do genoma circular do HPV é ativamente transcrita. O genoma possui oito regiões conhecidas como ORFS (*Open Reading Frames*), um complexo de proteínas funcionais codificadas pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, na região precoce, e que estão envolvidas no controle da replicação e transcrição virais durante o estado epissomal, e duas proteínas tardias que compõem o capsídeo viral (*L1* e *L2*) (30). A *LCR*, que possui a origem de replicação, situa-se entre *L1* e *E6*, em uma região de 500 a 1000 pb, representando cerca de 10,0% do genoma viral total (31).

1.4.2. Ciclo Fisiopatológico do HPV

O HPV é um organismo exclusivamente intracelular que infecta células mitoticamente ativas para se estabelecer no epitélio. Isto explica porque tanto carcinomas escamosos como glandulares se originam na junção escamocolunares e dentro da zona de transformação, pois nesse local há acesso imediato às células basais e para-basais do epitélio metaplásico (29). Após a exposição ao HPV, iniciam-se os eventos do ciclo viral, com a atividade específica coordenado por fatores que regulam a resposta imune do hospedeiro.

Quando o vírus infecta uma célula pode ocorrer infecção latente, na qual o DNA exposto reside no núcleo, a replicação viral fica adjunta ao ciclo celular, e as células infectadas têm aparência normal. Essa infecção latente pode converter-se em infecção ativa por mecanismos

ainda desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que a imunodepressão fisiológica (gravidez) ou patológica (AIDS) pode levar à infecção, ou volta ao estágio inicial com a recuperação da imunidade. A infecção latente só pode ser detectada através de estudos moleculares (32).

O ciclo de vida do papilomavírus é dependente do programa de diferenciação do epitélio infectado. O vírus infecta inicialmente células epiteliais basais, os quais estão ativamente em divisão celular. O DNA viral é mantido em um número pequeno de cópias dentro dos núcleos das células infectadas até que estas sofram diferenciação e sejam movidas à superfície do epitélio. Ao final da diferenciação celular, o vírus replicou diversas vezes apresentando um número elevado de cópias e, também, os genes tardios são expressos (32, 33).

Os vírions do HPV infectam as células epidérmicas germinais na camada celular basal, e essas células não permitem a replicação do HPV. À medida que as células germinais se dividem e se deslocam para a superfície, elas disseminam o vírus a todas as células irmãs. Essas células se transformam e proliferam de forma displásica. Essa camada celular fica mais espessa e cada célula passa a ficar vacuolizada, tomando uma aparência clássica de verruga. Portanto, a aparência de uma verruga deve-se à proliferação celular, e não à destruição de células. As células infectadas passam por um processo de diferenciação e queratinização, permitindo a replicação viral. Os vírions infectados são agrupados e liberados por essas células, podendo reinfectar as células adjacentes, e por essa razão as verrugas são contagiosas e aparecem agrupadas. Na medida em que o vírus amadurece e as partículas virais se agrupam, ele migra para células hospedeiras em direção à superfície; conseqüentemente, o vírus completo é encontrado apenas nas camadas epiteliais superiores. Se várias células basais diferentes, próximas umas das outras são infectadas, suas colônias em sobreposição adquirirão a aparência de uma verruga em forma de couve-flor. O tempo de incubação viral varia de acordo com o local da célula infectada. As verrugas nas mãos e nos pés apresentam um longo período de

incubação (seis a dezoito meses); já as verrugas genitais apresentam um curto período de incubação (dois a seis meses) (34).

Esse gradiente de replicação e manifestação do epitélio basal para o epitélio superficial tem implicações significativas para a detecção e o tratamento das infecções por HPV. Além de conter genomas únicos, os diferentes genótipos de HPV demonstram variabilidade em termos dos locais epiteliais nos quais são encontrados e das lesões que induzem. Um método simples de classificação divide os HPV em grupos cutâneos (infecta a pele) e mucosos (infecta as mucosas urogenitais e bucorespiratórias) (29).

Existem vários estágios diferentes de interação célula-vírus. O primeiro é a fase de incubação, que dura de duas semanas a oito meses (média de três meses). Esse é o período no qual se estabelece a infecção epissômica, com a interação célula-vírus, sendo regulada por fatores como tabagismo, deficiência do sistema imune ou predisposição genética. O vírus, inicialmente age como um plasmídeo extra-cromossômico auto-replicante - epissoma. Estes, a cada divisão mitótica da célula hospedeira, também serão replicados (35).

A infecção epissômica pode ocorrer com a inoculação em locais de micro-traumas, permitindo que os vírions penetrem na camada basal e liberem o seu capsídeo protéico externo. Já a infecção viral pode permanecer sem manifestação ativa da doença nas células basais provavelmente na maior parte das pessoas expostas ao HPV. A doença ativamente revelada resultará numa expressão morfológica em células escamosas diferenciadas. Quando isto ocorre, há uma fase de proliferação ativa que dura de três a seis meses. Durante esta fase, a estimulação das células hospedeiras leva à alteração pronunciada no crescimento da camada basal, replicação viral nas camadas médias e efeitos citopáticos virais nas células superficiais (36).

Estas alterações podem se manifestar como doença óbvia ou campos subclínicos de acetobranqueamento que contém graus variados de neoplasia ou formação de papilomas

macroscopicamente aparentes. A expressão ativa em longo prazo da doença (como por exemplo, condilomas ou neoplasia) após a exposição ao HPV é exceção, e não é tido como regra (37).

Após a resposta imune à infecção por HPV, inicia-se a fase tardia, com duração de três a seis meses; nesta fase, pelo menos 80,0% das mulheres infectadas permanecerão em estado de remissão clínica, mas poderão apresentar infecção persistente ou latente por HPV. A maioria das lesões tende a regredir espontaneamente pela resposta do sistema imunológico do hospedeiro, porém, não é possível prever nos casos de infecção por vírus de alto risco, para qual estado a infecção progredirá (38).

Uma verruga ou tumoração benigno é a manifestação patológica da infecção por HPV. Essas manifestações às vezes progridem para uma condição maligna, portanto, o HPV é um bom modelo para o estudo da progressão de tumores (39).

1.5. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydiae são bactérias patogênicas obrigatórias intracelulares, com parede celular semelhante a das bactérias gram-negativas, não-móveis e parasitas, amplamente distribuídas no Reino Animal.

Historicamente, todas as clamídias foram classificadas em uma única ordem, as *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, dentro de um único gênero *Chlamydia* e quatro espécies conhecidas: *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*. Todas as espécies, exceto *Chlamydia pecorum* estão associados a doenças em humanos (6).

Por apresentar ciclo biológico intracelular obrigatório, o gênero *Chlamydia* foi considerado inicialmente um vírus (40). Diferente dos vírus possui RNA, DNA e ribossomo típico de organismos procariotos. Por outro lado, apresenta duas unidades gênicas controladas por seqüências regulatórias comuns (operons), o que torna a *Chlamydia trachomatis* diferente dos demais procariotos. Elas exibem similaridades morfológicas e estruturais a uma bactéria gram-negativa, incluindo uma membrana trilaminar que contém lipossacarídeos e diversas proteínas de membranas que são estruturalmente e funcionalmente análogas a estrutura de *Escherichia coli* (41, 42, 43). O ciclo de desenvolvimento das clamídias é único e as diferencia de todos os outros microorganismos (41).

A espécie *Chlamydia trachomatis* está dividida em 15 sorotipos agrupados em 3 biotipos com base em diferenças biológicas. A infecção por *Chlamydia trachomatis* é a doença sexualmente transmissível mais bacteriana mais comum (44, 45).

O genoma de *Chlamydia trachomatis* é formado por um cromossomo circular, com 1.042.519bp (58,7% de A-T) e um plasmídio com 7493pb (número de acesso no Gen Bank AE001273). O genoma é extremamente pequeno e completo, o qual contém RNA ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S (46).

O genoma clamidial codifica para aproximadamente 875 proteínas, das quais setenta são exclusivas da espécie *Chlamydia trachomatis*. Até o momento foram seqüenciados os genomas dos sorotipos D, B e L2 de *Chlamydia trachomatis* (43).

A *Chlamydia trachomatis* se apresenta de duas formas, uma infecciosa extracelular, o corpo elementar (EB) de 350nm de diâmetro, que entra no endossoma da célula hospedeira através de fagocitose, pinocitose ou endocitose mediada por receptores na superfície da célula epitelial suscetível à infecção; e uma forma replicativa metabólica não-infecciosa, o corpo reticular (RB), de 800 a 1000nm de diâmetro. O ciclo biológico é completado dentro do

endossoma e se organiza na forma do corpo reticular (RB), maior em tamanho e mais rico em RNA (47). Após aproximadamente 8 horas, o corpo reticular começa a se dividir e em 18-24 horas, retorna à forma de corpo elementar, que é lançado para o meio extracelular, podendo iniciar um novo ciclo de infecção.

Chlamydia trachomatis tem sido estudada extensivamente devido a sua associação com tracoma ocular e sua importância como patógeno sexualmente transmissível. Tendo uma complexa antigenicidade, são poucos os antígenos importantes para o diagnóstico e patogênese da infecção: os antígenos lipossacarídeos (LPS), constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico e o antígeno da *major outer membrane protein* (MOMP), que são utilizados para a sorotipagem de espécie e subespécie (caracterização realizada através de painel de anticorpos monoclonais).

1.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE HPV E *Chlamydia trachomatis*

A mais comum manifestação clínica associada ao HPV é o *condiloma acuminado* (excrecência papilar única ou múltipla). Em princípio, a infecção por HPV pode ser classificada como *latente*, *subclínica* e *clínica*. Na forma latente é feito o diagnóstico através da hibridização do DNA em indivíduos com tecidos clínicos e colposcopicamente normais; portanto, esta forma refere-se aos casos em que, na ausência de evidências clínicas, colposcópicas, citológicas e histológicas de lesões, sejam identificadas seqüências de DNA de HPV com técnicas de hibridização molecular (48, 49).

Na forma subclínica, a infecção no colo uterino e nos genitais masculinos é a mais freqüente; esta infecção pode estar associada à neoplasia intra-epitelial e é diagnosticada com o uso do colposcópio após aplicação de ácido acético a 5,0%.

Em uma manifestação *clínica*, as lesões são observadas sem maiores dificuldades. Os *condilomas acuminados* (papilomas, verrugas) dos órgãos genitais externos em geral são pequenas neoformações sésseis, papilares, múltiplas, cobertas por epitélio queratinoso e raramente atingem o colo uterino.

Na forma clínica, as lesões podem ser únicas ou múltiplas, localizadas ou difusas e de tamanho variável. No homem, em geral ocorrem lesões na glândula, sulco bálano-prepucial e região perianal e, na mulher, vulva, períneo, região perianal, vagina e colo.

Com relação à infecção por *Chlamydia trachomatis*, o maior impacto da infecção clamidial se dá no aparelho reprodutor feminino (44). Embora a maior parte das infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* em mulheres seja assintomática, pode ocorrer manifestações como cervicite, uretrite, endometrite, DIP e abscessos na glândula de Bartholin. Quando sintomática, observa-se corrimento vaginal, disúria e sangramento e dor após as relações sexuais (50, 51).

O sítio inicial da infecção é usualmente a endocérvix, mas pode ocorrer na uretra e no reto. Infecções somente na uretra são incomuns, cerca de 5,0% a 30,0%; na endocérvix e uretra, 50,0% a 60,0% (43). A ascensão do microorganismo do trato geniturinário baixo para endométrio e trompas de Falópio pode ser a causa de dor no baixo ventre e anormalidades menstruais (52).

A DIP resulta de infecção ascendente e é responsável pela morbidade da infecção. O paradoxo em relação a esta infecção é que mesmo assintomática pode causar severa imunopatologia tubária. A salpingite latente e não tratada é a maior causa de infertilidade. Diversos estudos associam a infecção tanto sintomática quanto assintomática à gravidez ectópica, que pode ocasionar a morte do feto durante o primeiro trimestre de gravidez (44, 52, 53, 54, 55).

Em neonatos, a consequência mais comum é a conjuntivite de inclusão neonatal, e frequentemente é associada à pneumonia em bebês. A conjuntivite se desenvolve dentro de duas semanas após o nascimento e, quando não é tratada, pode ocasionar a pneumonia. O tratamento da pneumonia pode necessitar prolongada hospitalização, deixando como seqüela um risco de deficiência na função pulmonar e mesmo uma possível doença respiratória crônica.

Em homens, a infecção uretral é assintomática em 50,0%; quando sintomática, as manifestações ocorrem entre uma a três semanas após a exposição sendo indistinguível de uma infecção por gonorréia (secreção purulenta da uretra). No entanto, a uretrite clamidial sintomática é menos provável quando comparada à uretrite gonocócica. Entre as uretrites não-gonocócicas, a clamidial é responsável por 30,0% a 50,0% dos casos e, quando não tratada, pode levar a artrite ou Síndrome de Reiter. A epididimite ou infecção dos ductos espermáticos dos testículos é mais rara em jovens com idade menor de 35 anos sexualmente ativos, ao contrário do que pode ocorrer em faixas etárias maiores, na qual está associada a outras etiologias podendo provocar dor e inflamação escrotal, febre e sintomas uretrais.

Entre os homossexuais e bissexuais, a prevalência é um terço da relatada nos heterossexuais. Neste grupo o sítio mais freqüente de infecção é na mucosa retal, apresentando proctites e sintomas como tenesmo, diarréias e hemorragia.

O linfogranuloma venéreo (LVG) é uma doença sistêmica provocada pela *Chlamydia trachomatis* de sorovariedades L1 a L3. É altamente prevalente na África e América do Sul e ocorre tanto em homens como em mulheres. O sintoma primário é uma dolorosa úlcera ou pápula genital. Nos praticantes de intercurso anal, o sintoma mais freqüente é a proctocolite com um quadro clínico semelhante à doença inflamatória do intestino; secundariamente e o que leva o indivíduo a procurar o serviço médico é o nódulo inguinal, sendo menos freqüente nas mulheres.

O tracoma é uma doença crônica da córnea e conjuntiva, causada por repetidas infecções por *Chlamydia trachomatis* de sorovariedade A, B, Ba (56). As regiões endêmicas de tracoma foram reduzidas às áreas de inadequado sanitarismo e pobre higiene pessoal, deixando de ser a causa mais comum de cegueira em todo o mundo.

1.7. VIAS DE TRANSMISSÃO DE HPV E *Chlamydia trachomatis*

A transmissão do HPV pode ocorrer através de contato sexual, não-sexual e materno-fetal. Na maioria dos casos, a via sexual é a que representa maior risco, sendo a frequência de 10,0% a 15,0% em pacientes sexualmente ativos de idade entre 18 a 28 anos (33). É importante lembrar que o sexo oral também pode levar à transmissão do vírus e ao conseqüente aparecimento de lesão. Existem estudos que indicam que a auto-inoculação ou transmissão através de objetos de uso diário também é possível (33, 57).

Na forma de transmissão não-sexual, lesões verrucosas comuns da pele podem ser transmitidas por inoculação no próprio indivíduo ou em outro, através de fomitó (coçaduras, toalhas, roupas íntimas). Vale ressaltar que este vírus tem tropismo (predileção) pelas células dos epitélios escamosos, sendo que através de microlacerações o vírus é inoculado e invade células da camada basal. Embora não se saiba por quanto tempo o vírus resista fora do organismo, considera-se a que a infecção por fomitó seja viável por um curto período de tempo, e que mulheres e crianças sem atividade sexual também são considerados alvos para o desenvolvimento da infecção (57).

Já a transmissão materno-fetal pode se dar através do canal do parto. Em geral, durante a gestação as mulheres se tornam imunologicamente deprimidos e podem desenvolver lesões

exuberantes, por vezes de difícil tratamento, que podem regredir após o parto. Neste caso, o parto normal é contra-indicado. A inoculação acidental também é possível, ou seja, a manipulação das crianças pela mãe ou outro indivíduo com lesões verrucosas pode levar ao aparecimento de tais lesões (57).

Com relação à *Chlamydia trachomatis*, os fatores de risco para adquirir a infecção são diversos, destacando-se mulheres com mais de 20 anos quando estas são desquitadas, sem filhos; uso de contraceptivos orais, raça negra, classe sócio-econômica desfavorecida e o comportamento de risco como a promiscuidade e o não uso de preservativos (44).

O impacto maior da infecção por clamídia ocorre no sistema reprodutivo feminino. Aproximadamente, 65,0% dos recém-nascidos de mães infectadas contraem a infecção quando o parto é natural. O tratamento de pacientes infectados previne a transmissão ao parceiro sexual e a transmissão da gestante ao bebê durante o trabalho de parto. *Chlamydia trachomatis* pode ser transmitida ao feto durante o parto vaginal, resultando em pneumonia neonatal. Infecções vaginais, faríngeas e entéricas também já foram relatadas em neonatos (45, 50).

1.8. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV E *Chlamydia trachomatis*

A infecção por alguns tipos de HPV e por *Chlamydia trachomatis* tem sido reconhecida como carcinogênica para o colo uterino. O HPV de alto risco tem sido encontrado em proporções muito elevadas em mulheres com câncer invasivo e lesões pré-invasivas de alto grau, através da utilização de técnicas moleculares (PCR e captura híbrida II) (58). Por outro lado, a prevalência é baixa em mulheres citologicamente normais, exceto em mulheres jovens, que parecem ter uma alta incidência de infecções transitórias nos anos subsequentes ao início da atividade sexual. Alguns estudos sugerem o importante papel da presença e da persistência

de tipos de HPV de alto risco e de *Chlamydia trachomatis* na progressão de lesões pré-invasivas de baixo grau versus lesões de alto grau ao invés de regressão espontânea. Por essas razões, a tipagem do HPV e a identificação de *Chlamydia trachomatis* têm sido sugeridas como uma possível ferramenta de triagem primária (59).

1.9. JUSTIFICATIVA

Co-infecções por HPV e *Chlamydia trachomatis* são um grande problema de saúde pública, atingindo 10,0% a 20,0% a população sexualmente ativa entre 15 a 49 anos. Além de serem doenças sexualmente transmissíveis, estas geralmente são assintomáticas (70,0% a 80,0%), e os parceiros não tratados são potenciais reservatórios destes patógenos. Esta co-infecção é um dos principais fatores para o desenvolvimento de câncer cervical, que acomete cerca de 16.270 mulheres ao ano somente no Brasil. Além do câncer cervical, outras sérias complicações como DIP (18,0%-24,0%) e infertilidade tubária (6,0%-21,0%) são conseqüências desta co-infecção.

2. OBJETIVOS

Verificar a frequência de *Chlamydia trachomatis* e HPV em uma população de mulheres assintomáticas.

2.1. Objetivos Específicos

1. Conhecer a prevalência de HPV e *Chlamydia trachomatis* que acomete a população arrolada;

2. Identificar os fatores estudados (fumo, parceiros sexuais, uso de anticoncepcionais, idade) com estas infecções e verificar a associação destas com etiologia de lesões cervicais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ESTUDO DA POPULAÇÃO

O presente estudo será realizado em mulheres de uma área populacional atendida por serviços de atenção primária do Serviço de Saúde Comunitária Jardim Leopoldina do Grupo Hospitalar Conceição (SSCGHC), em Porto Alegre, RS.

Serão convidadas a participar do estudo, mulheres selecionadas aleatoriamente e que atenderam os critérios de elegibilidade e concordarem em participar do estudo proposto. Para ser elegível a mulher deve pertencer à área geográfica acima descrita, deve ter iniciado vida sexual, não deve ter diagnóstico prévio de câncer de colo uterino e não deve ter sofrido histerectomia.

As pacientes que consentirem em participar do estudo, assinam a sua concordância no formulário de consentimento pós-informado. Para o presente estudo, foi estimado um número de 1217 mulheres.

3.2. AMOSTRAS CÉRVICO-VAGINAIS

Após terem sido selecionadas, as participantes responderão a um questionário epidemiológico padronizado e encaminhadas à consulta ginecológica. As amostras de ectocérvice e endocérvice uterina serão coletadas para análise através de citologia convencional e pela técnica de PCR que será desenvolvida no laboratório de Biologia Molecular do CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)/LACEN.

Para a coleta do material biológico, a ectocérvice primeiramente será higienizada com gaze para a remoção do excesso de muco e realizada a coleta de três *swabs* endocervicais, sendo que um destes será utilizado na análise microscópica direta de microorganismos. Após a análise direta, será coletado o próximo *swab* para a transferência do material a uma lâmina estéril, para o exame de rotina de Papanicolaou; e o terceiro *swab* será imerso em 2mL de meio de transporte TE (10mM Tris-HCl pH 8,5; 1mM EDTA) para análise molecular do vírus através da PCR. O transporte das amostras será realizado em condições de baixas temperaturas e armazenado em freezer à -20°C.

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Após o descongelamento, as amostras serão centrifugadas a 5.200rpm, sob refrigeração, e o sedimento ressuspendido em tampão TE num volume final de 500µL. Após esse tratamento, uma alíquota correspondente a 100µL da amostra será tratada com 100µL de Proteinase K/TE-50 (200 µg/ml de proteinase K “DNASE/RNA free” Gibco, 2,0% Tween 20, 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8,5) e incubados por 18 h a 37°C. Após inativação a 94°C durante 10 min, as amostras desproteinizadas serão submetidas à amplificação por PCR para o diagnóstico de HPV e *Chlamydia trachomatis*.

3.4. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (PCR) PARA HPV

O DNA das amostras clínicas será submetido à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se como *primers* consensos os seguintes oligonucleotídeos degenerados, complementares à região L1 do genoma viral do papilomavírus humano (60):

My 09 5'... CGT CC^{A/C} AA^{A/G} GGA ^{A/T}AC TGA TC...3'

My 11 5'... GC^{A/C} CAG GG^{A/T} CAT AA^{C/T} AAT GG...3'

As reações serão realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (CenBiot), *primers* na concentração de 50ng/µL cada, 3,0mM de MgCl₂, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50mM de KCl, DNA e H₂O q.s.p 50 µL.

As seguintes condições serão utilizadas para amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96: 95°C por 13 min, para desnaturação; 40 ciclos subsequentes de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, para amplificação; 72°C por 5 min, para extensão final; 4°C para estoque dos produtos amplificados.

Para controlar o funcionamento da reação, será ensaiado, juntamente com cada PCR de DNA de amostras clínicas, um controle positivo de reação (CPR), que consistirá de um fragmento de 450pb correspondente às células Caski e Siha (células infectadas com o vírus HPV); e um controle negativo de reação (CNR) com omissão de qualquer DNA. Em todas as amostras testadas será utilizado *primers* complementares ao gene da β-globina humana como controle interno da reação.

Os produtos de PCR serão analisados em géis de agarose 2,0%, em tampão TBE 1x, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV). O volume de produto amplificado aplicado no gel corresponderá a 15µl. As condições de corrida eletroforética serão de 100V, com corrente de 50mA e por tempo de 40 minutos. O tamanho dos fragmentos gerados por amplificação será controlado pelo uso de marcador de tamanho molecular em escala de 100pb e do CPR que correspondia a 450pb.

3.5. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (PCR) PARA *Chlamydia trachomatis*

O DNA das amostras clínicas também será submetido à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Chlamydia trachomatis*, utilizando-se os *primers* CTP1 e CTP2 que flanqueiam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico de *Chlamydia trachomatis* (61). Este segmento localiza-se a 2940pb do sítio único de restrição de BamHI:

CTP1 5'... TAGTAACTGCCACTTCATCA...3'

CTP2 5'... TTCCCCTTGTAATTCGTTGC ... 3'

As reações serão realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2,5U da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), *primers* na concentração de 12,50pmol cada, 3,0mM de MgCl₂, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50mM de KCl, DNA e H₂O q.s.p 50 µL.

As seguintes condições serão utilizadas para amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96: 94°C por 1 min, para ativação da enzima *Taq Platinum*, 95°C por 4 min,

para desnaturação; 40 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de: uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 66°C por 1 min e uma etapa de 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final, uma etapa de 72°C por 4 minutos, para extensão final.

Para controlar o funcionamento da reação, será ensaiado, juntamente com cada PCR de DNA de amostras clínicas, um controle positivo de reação (CPR), que consistirá de um fragmento de 201pb correspondente a uma amostra clínica infectada por *Chlamydia trachomatis* (amostra positiva confirmada pelos métodos de PCR e Captura Híbrida); e um controle negativo de reação (CNR) com omissão de qualquer DNA. Em todas as amostras testadas será utilizado *primers* complementares ao gene da β -globina humana como controle interno da reação.

Os produtos de PCR serão analisados em géis de agarose 1,5%, em tampão TBE 1x, contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV). O volume de produto amplificado aplicado no gel corresponderá a 15 μ l. As condições de corrida eletroforética serão de 100V, com corrente de 50mAmp e por tempo de 40 minutos. O tamanho dos fragmentos gerados por amplificação será controlado pelo uso de marcador de tamanho molecular em escala de 100pb e do CPR que correspondia a 201pb.

3.6. TESTE DE ESPECIFICIDADE DOS *Primers*

A padronização da especificidade dos *primers* para o diagnóstico de HPV será realizada no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT/FEPPS). Para *Chlamydia trachomatis*, esta será realizada por Becker D e colaboradores (2005). A reação de amplificação será realizada com o DNA de diferentes microorganismos da microbiota normal do trato genito-urinário feminino, agentes patogênicos e DNA humano. Os DNAs de isolados clínicos

de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*, *Trichomonas vaginalis* e *Lactobacillus sp.* serão extraídos e purificados pelo método de CTAB (Cloreto de cetil-trimetilamônio) descrito por van Soolingen e colaboradores (1994) (62).

Os DNAs de HPV subtipos 16 e 33 serão obtidos pela técnica de lise por Proteinase-K (63). O DNA humano será extraído com DNAzol (Gibco-BRL, Life Technologies).

3.7. TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Para obter-se o DNA genômico de HPV será realizada a extração a partir de células Siha e Caski (células infectadas com HPV) As amostras serão submetidas à extração de DNA pelo método de Proteinase K e quantificado por espectrofotometria a 260nm no equipamento Genequant (Amersham Pharmacia Biotech) (63).

Com relação à *Chlamydia trachomatis*, o DNA genômico será extraído a partir de lâminas sensibilizadas com células clamidiais (*Chlamydia trachomatis* IgG IFA, Hemagen Diagnostics, Inc.). As lâminas serão raspadas com lâmina de bisturi e o material eluído e concentrado em tubo de microcentrífuga. A seguir, será realizada a extração através de kit comercial *Ultra Clean* (Mobio Laboratories Inc.). O DNA extraído será quantificado por espectrofotometria a 260nm no equipamento Genequant (Amersham Pharmacia Biotech).

Para a determinação da sensibilidade analítica da técnica, tanto para HPV quanto para *Chlamydia trachomatis*, será submetida diluições seriadas de DNA em água ultrapura ao protocolo de PCR, com detecção em gel de agarose, e à técnica de hibridização.

3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O banco de dados será elaborado no programa SPSS versão 10.0. Os bolsistas envolvidos no projeto serão responsáveis pela elaboração do mesmo e supervisionados pelos alunos de pós-graduação envolvidos no estudo. Para o controle de qualidade de entrada dos dados será feita conferência sistemática dos dados até então digitados com o questionário original de uma amostra aleatória de 20,0% dos registros.

As variáveis para análise serão as inclusas no instrumento de coleta e outras que poderão ser criadas a partir do banco de dados. Todas as análises serão realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS (versão 10.0).

4. ANÁLISE DOS DADOS

Descrição da frequência de HPV e de *Chlamydia trachomatis* (global e por faixa-etária).

4.1. Análise uni/bivariada

Teste do qui-quadrado (ou exato de Fisher se indicado) para comparar as variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho.

Teste t de *student* (ou não paramétrico correspondente) para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho.

4.2. Odds Ratio

A Odds Ratio será calculada para as análises uni/bivariadas e multivariadas (regressão logística) com seu correspondente intervalo de confiança de 95,0%.

Os critérios de seleção das variáveis para o modelo de regressão logística não condicional envolverão a significância estatística na análise uni/bivariada e/ou a relevância clínico-epidemiológica da variável mediante o conhecimento vigente.

5. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Estima-se que 30,0% das amostras apresentem resultado positivo para o DNA-HPV e que 5,0% apresentem positividade para o DNA de *Chlamydia trachomatis*. Com relação às alterações citológicas, estima-se que cerca de 10,0% a 20,0% das pacientes apresentem citologia alterada ao exame convencional. Logo, espera-se que a amostra será significativa para análise de associação entre a co-infecção de HPV e *Chlamydia trachomatis* com lesões cervicais.

Além disso, o conhecimento da distribuição dos subtipos oncogênicos mais frequentes e suas variações poderá ter um impacto importante sobre a implementação de futuros programas de vacinação para este vírus e programas de vigilância epidemiológica para o controle das doenças sexualmente transmissíveis (DST).

6. RISCOS E DIFICULDADES

Cuidado especial deverá ser tomado para que a quantidade de material para análise molecular seja suficiente para o processamento das técnicas. Como o estudo será realizado em mulheres de uma população geograficamente definida, com registro na unidade de atenção primária e de fácil acesso acredita-se que este risco bem como uma possível perda de seguimento seja bastante minimizado.

7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo apresenta um benefício direto para as participantes que é a identificação de uma infecção genital viral e bacteriana e sua associação com o desenvolvimento de lesões cervicais. Isto permite um programa de rastreamento eficiente que possibilite identificação de alterações pré-malignas as quais podem ser eliminadas pela detecção e tratamento precoces. O benefício indireto é a contribuição do estudo para o conhecimento científico nesta área, envolvendo um importante problema de saúde pública em nosso meio.

Os riscos envolvidos no estudo envolvem os riscos inerentes ao procedimento de coleta de material cervical (dor discreta, ocasional, pequeno sangramento pós-exame em especial se for realizada biópsia, e ardência no momento do exame de inspeção do colo a olho nu e pela colposcopia).

Um outro risco que poderá ser gerado no decorrer do estudo é a ansiedade naquele grupo de mulheres que apresentarem anormalidades citológicas e que se enquadrar em grupo de alto risco para o desenvolvimento de lesões cervicais severas. Porém como o objetivo do

rastreamento é, não só prevenção, como também detecção precoce de lesões pré-malignas, a possibilidade de eliminar a provável causa da ansiedade é bastante elevada, evitando sofrimento futuro.

A todas as mulheres elegíveis para o estudo serão dadas informações detalhadas sobre o estudo, incluindo risco e benefício, e as que concordarem em participar deverão assinar um termo de consentimento pós-informação (anexo IV).

8. EQUIPE DE PESQUISA

Coordenador: Profª Drª Mary Clarisse Bozzetti

Pesquisadores colaboradores: Drª Elizabeth Herrera, Dr. Alexandre da Silva Aguiar, Drª Daniela Montano Wilhelms, Drª Adriana Rosa, Dr. Eduardo Lahude Lima, Drª Cléia Bertinetti Bandeira.

Alunos de Pós-Graduação (mestrado/doutorado): Cristine Nascente Igansi, Lídia Medeiros, Luciane Calil Mylius e Marilda Tereza Mar da Rosa.

Bolsistas de Iniciação Científica: 5(cinco) já selecionados (2 CNPq; 1 FAPERGS e 2 voluntários).

Serviços Colaboradores:

- Serviço de Patologia do GHC (citologia e histologia).
- Laboratório do Centro de Pesquisas do HCPA.
- Serviço de Patologia do HCP (gene p16).
- Serviço de ginecologia do GHC (colposcopia e tratamento).
- Gerencia de saúde Comunitária do GHC.
- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT)/Fundação estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)/Laboratório Central (LACEN)/RS.
- Unidade Jardim Leopoldina /SSC/GHC (participantes do estudo).
- Coordenação do Programa da Mulher /SSC/GHC.

9. FINANCIAMENTOS

O estudo dispõe:

- Verba parcial para realização de algumas etapas do estudo fornecido pela Fundação de Auxílio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (valor: R\$ 4.000,00).

- Verba para a realização do método PCR de edital da SSMA/RS (valor: R\$ 6.000,00).

- Verba CAPES/PROF: PPG Clínica Médica (valor: R\$ 3.000,00); PPG Epidemiologia (valor: R\$ 3.000,00).

-Verba FIPE/HCPA: verba para realização de imuno-histoquímica para P16 (R\$4.000,00).

-Verba CNPQ/Edital 2003; valor R\$ 20.000,00

-Dispõem de 2 bolsas PIBIC/CNPq, 1 bolsa BIC/PROPESQ e 1 bolsa Produtividade em Pesquisa/CNPq.

10. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Mês	Ano	Atividade
Abril	2004	- Elaboração do projeto. - Coleta dos dados.
Maio/Dezembro	2004	- Coleta dos dados. - Revisão Bibliográfica. - Submissão ao Comitê de Ética. - Realização da técnica de PCR para diagnóstico de HPV
Janeiro/Maio	2005	- Revisão Bibliográfica. - Coleta dos Dados. - Elaboração do Banco de Dados. - Realização da técnica de PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>
Junho/Julho	2005	- Revisão Bibliográfica. - Análise dos Resultados. - Redação da Dissertação de Mestrado.
Agosto	2005	- Divulgação dos dados junto à unidade e à população. - Revisão final e defesa de mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia/UFRGS.

11. ORÇAMENTO TOTAL DO ESTUDO

11.1. Material de Consumo:	US\$ (23/07)
	(US\$ 1,00 = R\$ 2,48)
1. Etapa inicial do estudo (primeiros 2 anos)	
- 2050 lâminas e lamínulas	1779,4 (unid.:0,868)
- Luvas p/coleta do citológico (4000)	1936,0 (unid.:0,484)
- 14 caixas para armazenamento de lâminas (150 p/caixa)	347,20 (unid.:24,80)
- 10 pctes. de papel A4 para questionários e	
- Manual de instruções (pctes c/500)	99,20 (pcte.:9,92)
- 800 tubos plásticos c/tampa para armazenamento de sangue (40 ml) (unid. c/25)	5404,16 (unid:168,88)
- 6800 seringas (50 ml) para coleta de sangue	1584,00 (unid: 1,98)
- 23 kits captura híbrida II p/ 2000 testes p/HPV (alto risco)	23875,61 (u.:1038,07)
- 2250 coletores p/captura híbrida	3172,5 (u.:1,41)
- 430 tubos para coleta material cervical p/PCR	3039,8 (unid:168,88)
- Reagentes p/a citologia	1674,00 (u.:0,670)
- Containers para armazenamento e envio do material p/captura híbrida	200,00
Total item 1	42.911,72

2. Segunda Etapa do estudo (últimos 3 anos)

- 1300 escovas endocervicais	975,00 (unid:0,75)
- Material para PCR de HPV e <i>Chlamydia trachomatis</i>	
- DNTPs (oligonucleotídios)	1660,00 (250µl:830,00)
- Taq <i>Platinum</i> DNA polimerase	2600,00 (500 unid: 325,00)
- Proteinase K	300,00 (01 frasco)
- Prometo de etídio	144,00 (5ml -72,00)
- Primers para HPV 16 e 18	550,00
- Primers para <i>Chlamydia trachomatis</i>	550,00
- Agarose 1%	64,00
- Ponteiras 100-1000µl	60,00 (30,00/1000 unid)
- Ponteiras 1-10µl com filtro	470,00 (235,00/1000 unid)
- Ponteiras 1-200µl	60,00 (30,00/1000 unid)
- Ponteiras 100-1000µl com filtro	510,00 (255/1000unid)
Total item 2	7943,00

3. Recursos Humanos

1. Bolsistas de iniciação científica (3)	--
2. Leitura Cito/histopatologistas	--
3. Diagnóstico Colposcópico	--

Total geral (exceto item 3) 50.854,72

**ADENDO REFERENTE AO PROJETO “A DISTRIBUIÇÃO DE
PAPILOMAVÍRUS HUMANOS ONCOGÊNICOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
LESÕES DO COLO UTERINO”, APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA Nº 112/2202**

Solicito parecer do Comitê de Ética referente ao adendo anexado à este projeto já aprovado por este Comitê, sob protocolo nº 112/202.

As amostras que serão utilizadas para o desenvolvimento deste projeto são oriundas de material já coletado de pacientes que participam de um estudo de coorte (Protocolo 112/2002) em andamento desde fevereiro de 2003 na Unidade Jardim Leopoldina.

A técnica empregada será por Biologia Molecular baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando *primers* específicos para o diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis*. O material para análise consta de amostras provenientes de ectocérvice e endocérvice, coletadas através de escovado de cérvice uterina, armazenado em meios especiais para coleta e armazenamento à -20°C . As amostras endocervicais serão submetidas à extração de DNA e posteriormente será realizado PCR para detecção do DNA viral de HPV utilizando *primers* consensus MY09/MY11.

Em adição ao protocolo previamente aprovado serão realizados ensaios moleculares através da técnica de PCR, nas mesmas amostras cervicais, para detecção da bactéria *Chlamydia trachomatis*, com o objetivo de estudar e verificar a associação da co-infecção de HPV e *Chlamydia trachomatis* em lesões cervicais. Diversos estudos estão considerando a *Chlamydia trachomatis* como um co-fator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferenczy A, Franco E. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3(1):11-6.
2. Kalakun L, Bozzetti MC. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rio de Janeiro: Cad. Saúde Pública* Jan-Fev 2005; 21(1):299-309.
3. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA). Câncer de Colo de Útero. 2004.
4. de Lima Soares V, de Mesquita AM, Cavalcante FG, Silva ZP *et al.* Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health* 2003 Jul; 8(7):595-603.
5. Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M *et al.* Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002 Aug; 43(4):277-281.
6. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002 Feb 1; 185(3):324-331.

7. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C *et al.* Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002 Oct 9; 288(14):1749-1757.
8. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL *et al.* Multiple high-risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004 Jan; 57(1):68-72.
9. Becker D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por Reação em Cadeia da Polimerase (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular 2005. P. 90.
10. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005 March; 32Suppl:S16-S24.
11. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human Papillomavirus and cervical cancer - burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:3-13.
12. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999 Jun 2; 91(11):954-960.

13. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999 Nov;180(5):1415-1423.
14. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998 Feb 12; 338(7):423-428.
15. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6; 348(6):518-527.
16. Becker TM, Stone KM, Alexander ER. Genital human papillomavirus infection. A growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1987 Jun; 14(2):389-396.
17. af Geijerstam V, Wang Z, Lewensohn-Fuchs, Eklund C I *et al.* Trends in seroprevalence of human papillomavirus type 16 among pregnant women in Stockholm, Sweden, during 1969-1989. *Int J Cancer* 1998 May 4; 76(3):341-344.
18. Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL. *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2000 Feb; 6(2):88-93.

19. Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morré SA *et al.* Prevalence and determinants of *Chlamydia trachomatis* infections in women from Bogota, Colombia. *Sex Transm Infect* 2003 Dec; 79(6):474-478.
20. Vincelette J, Schim J, Bogard M, Bourgault AM *et al.* Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1999 Jan; 37(1):74-80.
21. Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM *et al.* *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol* 2005 Jan; 96(1):181-186.
22. Ramos MC, Becker D, Germany C. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela Reação em cadeia da Polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. *J Bras DST* 2003; 15(2):12.
23. Ramos MC, Becker D, Perin MT *et al.* Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples of men with urethrites in a public STD clinic in Porto Alegre, Brazil. *Int J STD and AIDS* 2002; 13(1):47.
24. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002 Feb 1; 185(3):324-331.

25. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T *et al.* A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 101:371-4.
26. Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e patogênese do Papilomavírus Humano (HPV). In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural; 2000.
27. Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin* 2001;51:92-114.
28. Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 25:709-720.
29. Münger K, Baldwin A, Kirsten M *et al.* Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol* 2004;11451-11460.
30. Howley PM. *Papillomavirinae: the viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM editores. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1996. P. 2045-2076.
31. Chan SY, Delius H, Halpern AL *et al.* Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995; 69:3074-3083.

32. Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural; 2000.
33. Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical Cancer, Treatment, and Prevention. Clin Lab Sci 2001; 14(03):183-186.
34. Reid RM., Greenberg MD, Jenson AB *et al.* Sexually transmitted papillomaviral infections I: the anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions with different viral types. Am J Obstet Gynecol 1987; 156:212-22.
35. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA *et al.* Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. J Nat Cancer Inst 1997; 89:796-802.
36. Jacyntho C, Almeida Filho G, Maldonado P. HPV: Infecção Genital Feminina e Masculina. São Paulo: Revinter; 1994.
37. Murray PR, Baron E, Falles MA *et al.* Manual of clinical Microbiology. 7th ed. Am Soc Microb; 1999.
38. Zür Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections: Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. Lancet 1986; 2:489-491.

39. Ferenczy A, Mitao J, Nagai N. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J K Med* 1985; 313:784.
40. Schachter J, Stamm EW. *Chlamydia trachomatis*. In: autores *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, D.C.: ASM Press: 1999. P. 669-677.
41. Moulder JW. Looking at chlamydiae without looking at their hosts. *Am Soc Microbiol News* 1984; 50:353-362.
42. Comanducci M, Ricci S, Cevenini R *et al*. Diversity of the *Chlamydia trachomatis* common plasmid in biovars with different pathogenicity. *Plasmid* 1990; 23:149-154.
43. Stephens RS, Kalman S, Lammel C *et al*. Genome sequence of an obligate intracellular pathogens of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998; 282:754-759.
44. Black MC. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rewiews*. 1997; 1:160-184.
45. Manhony JB, Coombes BK, Chernesky MA *et al*. *Chlamydia* and *Chlamydophila* In: *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003 P.991-1004.
46. Thomas NS, Luscher M, Storey CC *et al*. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology* 1997; 143:1847-1854.

47. Hall SG. *Chlamydia trachomatis*: Update on laboratory diagnosis. Check Sample. ASCP 1997; 49(4):49-61.
48. Dores GB, Taromaru EK, Gallo C *et al.* Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV-induzidas e do câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. Newslab 1999; 35: 196-205.
49. De Palo G, Stefanan B, Pillotti S. Infecção pelo Papilomavírus. In: De Palo G editor. Colposcopia e patologia do trato genital inferior. Rio de Janeiro: Medsi; 1996. P.125-89.
50. Francisco W. Gonococcias e Clamídias. In: Ferreira AW & Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1996. P. 101-108.
51. Warford A, Chernesky M, Peterson EM. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2003. P. 2-18.
52. Weinstock H, Dean D, Bolan G. *Chlamydia trachomatis* infections in Sexually Transmitted Diseases in the AIDS Era: Part II. Infections disease clinics of North America 1994; 8(4).
53. Hills DS, Wasserhiet NJ. Screening for *Chlamydia trachomatis* – A key to the prevention of pelvic inflammatory disease. N Engl J Med 1997; 334(21):1399-1401.

54. Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M, Bobo L. Epidemiologic and microbiology Correlates of *Chlamydia trachomatis* Infection in Sexual Partnerships. JAMA 1996 Dec 4; 276(2):1737-1742.
55. Gaydos C, Crotchfelt AK, Howell MR *et al.* Molecular amplification assays to detect Chlamydial infections in urine specimens from High School Female Students and monitor the persistence of Chlamydial DNA after therapy. JID 1998.
56. Bowe RW, King KH. *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). In: Principles and Practices of Infectious Diseases. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone Inc; 1995.
57. Gross GE, Barrasso R. Infecção pelo papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.
58. Bauer HM, Ce Greer R, Mannos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR. In: Herrington CS, McGee JD editores. Diagnostic molecular pathology: a practical approach. England: Oxford University Press; 1992.
59. Ronco G. Use of molecular tests of human papillomavirus (HPV) as screening test for cervix cancer: a review. Epidemiol Prev 1999; 23:372-377.

60. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH *et al.* Determinants of genital papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20:274-278.
61. Griffais R, Thibon M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1989; 140(2):139-41.
62. van Soolingen D, de Hass PEW, Hermans PWM *et al.* Isolation of genomic DNA from *Mycobacteria*. In: *RFLP Analysis of Mycobacteria*. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Beethoven, The Netherlands 1994. P.5-10.
63. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J *et al.* Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):902-907.