Rodrigo Alessandro Riemma Vela

Relação de infectividade entre Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu para a obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: João Manuel Grisi Candeias

Botucatu-SP
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Vela, Rodrigo Alessandro Riemma.
Relação de infectividade entre Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida / Rodrigo Alessandro Riemma Vela. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2006.
Orientador: João Manuel Grísi Candeias
Assunto CAPES: 40101096

1. Papiloma (HPV) 2. Virologia 3. Gravidez - Doenças infecciosas

CDD 616.9
CDD 618.1
Palavras-chave: Condiloma; *Chlamydia trachomatis*; Gestação; HPV; PCR

Dedicatória

Dedico esse trabalho
Aos meus pais David e Célia
E minha irmã Juliana,
Que sempre estiveram do meu lado,
Me apoiando, me ajudando e
Participando de todas as etapas
Nesta jornada.
Sem vocês nada disso teria
Valido a pena.
Amo vocês!

Agradecimento Especial

Ao meu orientador João Candeias,
Por ter me ensinado tudo que sei,
Por ter me dado apoio e incentivo,
E por ter me dado a oportunidade
De trabalhar naquilo que gosto.
Valeu!

Agradecimento Especial

Ao Prof. João Pessoa,
Por ter me ajudado e ensinado sempre,
Por mostrar em várias oportunidades
O caminho correto que eu deveria seguir.
Valeu!

Agradecimento Especial

À Profa. Márcia Guimarães,
Que sempre esteve presente quando precisei,
Me ajudando, me ensinado
E acreditando no meu trabalho.
Ajudando a tornar possível
Que eu chegasse até aqui.
Muito obrigado!

Agradeço

- a todos os meus professores pelos ensinamentos e conhecimentos adiquiridos;
- a meus grandes amigos Margá, Gyraya, Keila, Thiago e Raul por todos os momentos bons que passamos, por todas as cervejas que tomamos, por todas as piadas que contamos, por tudo aquilo que vivemos e que ficarão para sempre independente dos caminhos que tomemos;
- à Kero pela amizade, pela companhia e pela ajuda na organização e manutenção da rotina do laboratório, e também por toda a ajuda imprescindível na realização desse trabalho;
- a todo o pessoal do Laboratório: Aline, Andréa, Andreza, Carol, Flávio, Marcela, Michele, Taís, Telma e Zé Augusto por todos os momentos de descontração que tivemos, os quais transformaram o local de trabalho em um ambiente agradável, a todo trabalho em grupo e por todos os outros momentos compartilhados;
- a todos os funcionário do departamento, Ademival, Dito, Luiz, Lula, Tino e Pedro por toda a ajuda, pelos cafézinhos e todo o tipo de serviço prestado;
- à todos os docentes, pós-graduandos e estagiários do departamento de Microbiologia e Imunologia;
- às secretárias Nice e Sônia pela ajuda e esforços prestados ao departamento todos os dias;
- às meninas da patologia, Carol e Xereca, cuja ajuda também foi indispensável à realização deste trabalho;
- ao pessoal da Parasitologia: Aline, Bianca, Jaime, Karina, meus amigos e companheiros de turma Miséria e Finkada pela ajuda, tolerância e companheirismo; o chefe do laboratório, Paulo e sua esposa Débora, por toda a ajuda e pela amizade criada durante todo esse tempo;
- ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, especialmente Prof. José Eduardo e Clarisse Machado;
- à Ana Paula, por compor a banca da defesa desse trabalho;

- à República Kazadukaraiu e seus integrantes: Docinho, que também ajudou na realização deste trabalho, Lindinha, Kama-Sutra e Prepúcio por tudo que vivemos, por todos os churrascos, pelas partidas de sinuca, pelo macarrão com salsicha ou frango assado de todo domingo, pelas festas, pela mágica de conseguirmos encaixar todos os carros na garagem, pelo ambiente agradável e sempre divertido no qual convivemos todo esse tempo;
- a todos os ex-integrantes e agregados da república supra citada: Buxexa, Cabeça, Fiçura, Macumba, Merla e Peky por todos os momentos que tivemos em tanto tempo que convivemos em harmonia;
- à República A Praia, na qual morei durante dois anos e que teve papel importante em vário momentos de minha vida;
- ao pessoal e agregados da República Unespintudo: Babito, Comedião, Fusuê, Godinees, Ku-Rompido, Mingo, Prumo, Sakuda e tantos outros;
- a meus primos Viviane e Othon e os a eles agregados, Dora e Wagner por todas as baladas, pelas "ratices", apoio e companheirismo;
- às companheiras de balada, Bilola e Picanha, por terem me aturado diversas vezes;
- à toda minha família, que de uma forma ou outra esteve presente em grandes momentos de minha vida em todos esses anos;
- à XXXVI turma de Biomedicina, por ter participado do início da minha formação profissional;
- ao Instituto de Biociências por fornecer as condições necessárias à realização deste trabalho;
- à todas as pacientes que gentilmente cederam material para que se realizasse a pesquisa;
- aos departamentos de Patologia, Ginecologia e Obstetrícia e Dermatologia que contribuíram de várias formas à realização do trabalho;
- à Dona Ana, que nos aguentou, que por várias vezes fazia milagres para conseguir fazer almoço para todos;
- à Zilda também por ter nos aguentado todo esse tempo;

- ao Encontro Regional de Biomedicina e todos os integrantes que por ele passaram, o qual participei durante algum tempo e me ensinou muito;
- à cidade de Botucatu, que me acolheu nesses seis anos que aqui morei;
- à escola Drum Shop e especialmente ao Érik, que no pouco tempo que lá fiquei, me fez passar do nada ao meia boca no violão;
- à Pérola, Tina e Purguento, pelas brincadeiras e momentos divertidos que eles cumpriram na sua tarefa de "melhor amigo do homem";
- à uma das melhores invenções do homem: a máquina de xerox, que nos poupa tempo e trabalho;
- ao botão desfazer do Windows, que evitou, por várias vezes, que todo o trabalho fosse por água abaixo;
- à máquina de gelo picado que além de nos poupar tempo e trabalho diariamente ainda contribuiu para gelar cerveja diversas vezes;
- ao Passarinho, Bigode, Osmarajá, Gordo e Tiazinha do Laissez-faire pela cervejas tomadas em momentos de descontração;
- ao Engov, Ranitidina, Aspirina, Coca-Cola e Café, que tiveram papel importante no pós balada;
- a todos os disk lanche que mataram minha fome nas horas de aperto;
- ao Super Mercado Central, no centro da cidade, que gentilmente cedeu seu estacionamento para que eu almoçasse ali perto;
- e a todos que de alguma forma estiveram junto comigo nessa jornada;

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Pessoa

Resumo

Introdução: Foram estudadas 112 gestantes atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais (AIG) do Hospital das Clínicas, UNESP, Botucatu, no período de março de 2001 a julho de 2005. Todas as gestantes apresentavam lesões genitais sugestivas, pela patologia, de doença HPV induzida. Para essas lesões foi avaliado o local da coleta das mesmas e a presença do vírus HPV e da bactéria *Chlamydia trachomatis*. Nessas pacientes também se analisou a idade, o estado civil, o uso de anticoncepcional, infecções genitais e a paridade. Ambos os agentes causam problemas na gestação, tais como baixo peso aos nascer e parto prematuro. **Casuística e Métodos:** As pesquisas tanto de HPV como de *Chlamydia trachomatis* foram realizadas através de PCR utilizando-se, respectivamente, os *primers* GP5+ e GP6+ e PCT1 e PCT2. Os HPV's foram tipados por sequenciamento. **Resultados:** A positividade de HPV foi de 79,31%. Com relação aos tipos os mais encontrados foram o 6 e o 18. Para a *Chlamydia* a positividade foi de 15,8%. **Conclusão:** Os dados encontrados em nosso estudo são compatíveis com os encontrados na literatura em todo o mundo, demonstrando que, mesmo em países desenvolvidos, a taxa de mulheres contaminadas com HPV é muito alta. Com relação à *Chlamydia*, os dados também são compatíveis com os da literatura mostrando associação clara entre a presença dos dois agentes e problemas gestacionais.

Sumário

1.Introdução.....pág 02
1.1. Papiloma Vírus Humano.....pág 04
1.1.1.Histórico.....pág 05
1.1.2.Agente infeccioso.....pág 05
1.1.3.Replicação.....pág 07
1.1.3.1 .Adesão, entrada e desnudamento.....pág 07
1.1.3.2 Regulação da transcrição, promotores e expressão.....pág 08
1.1.3.3. Replicação Viral.....pág 09
1.1.3.4. Transformação e imortalização.....pág 10
1.1.4.Infectividade.....pág 11
1.2. *Chlamydia trachomatis*.....pág 11
1.2.1. Classificação.....pág 12
1.2.2. Aspectos Estruturais e Fisiológicos.....pág 12
1.2.3. Fatores de Virulência, Ciclo Celular e Patogênese.....pág 12
2.Objetivo.....pág 16
3.Casuística e Métodos.....pág 18
3.1.Gestantes.....pág 18
3.2.Colheita das Amostras.....pág 18
3.3.Pesquisa de HPV e *Chlamydia trachomatis*.....pág 19
3.3.1.Extração do ácido nucléico.....pág 19
3.2.Amplificação do ácido nucléico (PCR).....pág 19
3.3.3.Visualização dos produtos amplificados.....pág 20
3.3.4.Controle de extração através da amplificação do gene da β-globina.....pág 21
3.4.Tipagem de HPV por sequenciamento.....pág 21
3.5.Cultura de células HeLa como controle positivo das PCR's.....pág 22
3.6.Cultivo de *Chlamydia trachomatis*.....pág 23
4.Resultados.....pág 25
4.1.Prevalência do HPV e *Chlamydia trachomatis*.....pág 25
4.2.Sensibilidade das Reações.....pág 33
4.3. Análise histopatológica das lesões.....pág 33
5.Discussão.....pág 35
5.1.Positividade de HPV.....pág 35
5.2.Positividade de *Chlamydia trachomatis* e associação com HPV.....pág 36
5.3.Associação de HPV e *Chlamydia trachomatis* com outros fatores.....pág 36

6.Referências Bibliográficas.....pág 41
7.Anexos.....pág 47
7.1Termo de consentimento livre e esclarecido.....pág 47
7.2Aprovação CEP.....pág 48

Lista de Figuras

Figura 1 Fotomicrografia eletrônica de HPV.....pág 05

Figura 2 Desenho esquemático do genoma do HPV. Pode-se identificar as três regiões: Região Longa de Controle (LCR), Região Precoce (E1 a E8) e Região Tardia (L1 e L2).....pág 07

Figura 3 Mapa de transcrição do HPV. A linha preta indica o genoma viral. Em amarelo vê-se as *ORFs*. Mais abaixo, nas linhas vermelhas ligadas às caixas amarelas temos exemplos de mRNA gerados por *splicings* alternativos.....pág 08

Figura 4 Ciclo celular da *Chlamydia trachomatis.* Em 1 temos a formação do vacúolo, diferenciando-se em 2. Em 3 temos a multiplicação dos corpúsculos, tonando-se visíveis no microscópio. Em 4 ocorre nova diferenciação e em 5 ocorre a liberação das partículas.....pág 13

Figura 5 Foto de cultura de células McCoy infectadas por *Chlamydia trachomatis.* As setas vermelhas mostram os corpúsculos de inclusão, indicativos da infecção.....pág 23

Figura 6 Porcentagem de positividade de DNA de HPV detectadas por PCR nas lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzida.....pág 25

Figura 7 Porcentagem de positividade para *Chlamydia trachomatis* detectadas por PCR nas lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzida. Na barra vermelha temos as positivas e na verde as negativas.....pág 26

Figura 8 Foto de gel de agarose de amostras de HPV utilizando-se os *primers* MY09/MY11. L indica o *ladder* de 100 pb. A seta mostra altura das bandas positivas de 460 pares de base. Pode-se também ver o controle negativo (No) e o positivo (C+).....pág 27

Figura 9 Foto de gel de agarose de amostras de *Chamydia trachomatis*. L indica *ladder* de 50 pares de base. A seta mostra altura das bandas positivas de 260 pares de base. Pode-se também ver o controle negativo (No) e o controle positivo (C+).....pág 27

Figura 10 Número de amostras positivas em relação ao tipo de HPV. Neste gráfico estão representados apenas os genótipos de HPV individualmente, sem se considerar as infecções mistas, desta forma a soma dos valores é maior que o total de amostras. Em vermelho podemos ver os totais de HPV6, em azul os totais de HPV11, em verde os totais de HPV16, em amarelo os totais de HPV18 em roxo os totais dos outros tipos.....pág 32

Figura 11 Eletroferograma mostrando sequência de bases do *primer* MY09 de uma das amostras. Cada uma das cores refere-se à uma das bases, sendo adenina em verde, citosina em azul, timina em vermelho e guanina em preto. Os picos mostram a intensidade de cada base no *lócus* específico e sua respectiva intensidade.....pág 32

Lista de Tabelas

Tabela 4.1. Relação de positividade entre HPV e *C. trachomatis* nas 128 gestantes incluídas no estudo, atendidas na AIG, no período entre junho de 2004 e julho de 2005. As porcentagens referem-se ao total de pacientes analisadas (128). Temos os totais de positivos e negativos nas linhas. Nas colunas temos os totais de positivos e negativos de HPV. A análise estatística baseou-se no teste de McNemar (X^2=54,4; P<0,001).....pág 26

Tabela 4.2. Relação entre a região da localização da lesão sugestiva de doença HPV induzida nas gestantes incluídas no estudo e a positividade de HPV e *C. trachomatis*.Nas linhas temos as regiões de análise das lesões nas pacientes. Nas colunas temos o número total de cada amostra, a positividade para o HPV, a positividade de *C. trachomatis* e os valores da análise estatística (teste Z).....pág 28

Tabela 4.3. Relação do método anticoncepcional utilizado pelas pacientes e positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos o método contraceptivo utilizado pelas pacientes. Nas colunas temos as positividades para HPV, para *C. trachomatis* e os valores da análise estatística (teste Z).....pág 29

Tabela 4.4. Relação da idade das pacientes com a positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos a faixa etária das pacientes. Nas colunas temos a positividade para HPV, para *C. trachomatis* e os valores da análise estatíatica.....pág 29

Tabela 4.5. Relação do estado civil das pacientes com a positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos o estado civil das pacientes. Nas colunas temos as positividades para HPV, para *C. trachomatis* e os valores das análises estatísticas.....pág 30

Tabela 4.6. Relação do número de gestações das pacientes e a presença de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos o número de gestação das pacientes. Nas colunas temos as positividades para HPV, para *C. trachomatis* e os valores das análises estatísticas.....pág 30

Tabela 4.7. Relação de infecção do trato genital inferior e positividade de HPV e *C. trachomatis*.Nas linhas vemos os tipos mais relevantes encontrado de infecções genitais. Nas colunas temos as positividades de HPV e *C. trachomatis* e os valores das análises estatísticas.....pág 31

Tabela 4.8. Relação da região da lesão nas pacientes e os HPVs de alto e baixo graus.

Nas linhas temos a região das lesões. Nas colunas temos os números de amostras
para alto e baixo riscos.....pág 33

1. Introdução

A gestação é um processo fisiológico que acarreta uma série de modificações locais e gerais no organismo materno. Inúmeras complicações indesejáveis ocorrem nesta condição e dentre essas, as infecções do trato genital inferior (TGI) vêm ganhando posição de destaque[1,2].

Uma das complicações a ser considerada durante a gravidez são as doenças sexualmente transmissíveis (DST). Não é raro encontrar gestantes que apresentam mais de uma infecção simultânea. Sendo assim, é necessário se fazer um pré-natal adequado e quando identificados os agentes infecciosos, pode-se adotar tratamento específico para os mesmos em conjunto com o controle no parceiro, quando necessário.Dentre as DST's que acometem as gestantes, podemos citar são a sífilis, gonorréia, clamídia, hepatite B, AIDS/HIV e o papilomavírus humano[3].

O ecossistema vaginal das gestantes não difere substancialmente daquele encontrado nas mulheres não grávidas. Ao contrário do que os estudos mais antigos apontavam a respeito de aumento progressivo na quantidade dos lactobacilos, com o avançar da idade gestacional[4], pesquisas mais recentes têm mostrado que a freqüência e quantidade dos mesmos permanecem relativamente constantes nos dois últimos trimestres de gestação[5].

Em relação aos lactobacilos, diversos estudos demonstraram menores taxas de complicações maternas e perinatais nas pacientes com predomínio dos mesmos em seus esfregaços vaginais corados pelo método de Gram, principalmente no que diz respeito ao Trabalho de parto Prematuro (TPP)[6-8]. Acredita-se que essa flora seja uma importante forma de proteção contra a aquisição de infecções do TGI. Teorias mais antigas postulavam ser a produção do ácido láctico, pelos lactobacilos, o mecanismo mais importante de defesa do meio vaginal. Estudos mais recentes, porém, evidenciaram que o ponto crucial é realmente a produção de H_2O_2 por determinadas cepas de lactobacilos, capazes ainda de elaborar bacteriocinas que interferem com a aderência bacteriana na célula epitelial vaginal e com a competição por nutrientes, inibindo assim o crescimento exagerado de outros germes comuns no meio vaginal[9].

Os lactobacillus das espécies *L. crispatus* e *L. jensenii* são os mais importantes produtores de H_2O_2, podendo-se concluir que a colonização vaginal de mulheres grávidas por esses microrganismos, em concentrações maiores ou iguais a 10^7 UFC/g de fluido vaginal, esteja diretamente relacionada com melhor prognóstico gestacional,

principalmente no que diz respeito à ocorrência de TPP, rotura prematura de membrana (RPM), prematuridade e corioamnionite[10]. Holst *et al.*[11] constataram que, quando na colonização vaginal predominavam lactobacilos não produtores de H_2O_2, o efeito protetor não era mais notado.

Dentre as doenças que acometem as gestantes, a *Chlamydia trachomatis* e o Papilomavírus humano são as que têm despertado maior interesse. Infecções causadas por *C. trachomatis* durante a gestação são preocupantes uma vez que estão associadas com problemas como partos prematuros e baixo peso do bebe ao nascimento[12]. Um estudo de revisão aponta que, em mulheres que tiveram sucesso no tratamento de *C. trachomatis*, o risco de prematuridade diminui em 84%, o de RPM em 69%, o de TPP em 87% e de baixo peso do recém-nascido em 55%[22]. Mulheres contaminadas pelo HPV podem desenvolver lesões na vulva, na vagina, no colo uterino e na região perianal. Destas, a mais preocupante é a lesão de colo uterino, pois tais lesões podem-se desenvolver tornando-se cânceres[4,14,15].

A gestação é freqüentemente associada ao crescimento de verrugas genitais, que merecem acompanhamento criterioso. Não há confirmação de que a infecção pelo HPV seja causa de aborto espontâneo, rotura prematura de membranas, ou que predisponha o local da episiotomia à deiscência. Acredita-se que esta seja decorrente de vulvovaginites e/ou cervicites concomitantes, mais freqüentes em gestantes com infecção pelo HPV. A associação das doenças sexualmente transmissíveis com a infecção pelo HPV ainda é assunto em pesquisa, com escassez de trabalhos conclusivos.

Estudo recente associa infecções Clamídianas com doença HPV induzida, sugerindo que a *C. trachomatis* funcione como um co-fator juntamente com o HPV para o desenvolvimento de neoplasias[15]. Para esses mesmos autores, pacientes infectados com HPV e *C. trachomatis* têm uma alta atividade de proliferação do epitélio ectocervical. Isso ocorre devido a uma redução de apoptose em células epiteliais, sugerindo que essa redução de apoptose, evento que leva a uma proliferação celular errônea, tem grande influência na formação de neoplasias.

É sabido que o HPV atua inibindo no hospedeiro humano o gene *p53*, o qual é um gene supressor tumoral, localizado no cromossomo 17p13,1, o qual através de sua proteína p53 impede a proliferação de células geneticamente danificadas. Sendo assim o gene *p53* atua como promotor da apoptose, levando células que não podem ser reparadas à morte celular programada[16].

Observações clínicas indicaram que infecções genitais com *C. trachomatis* estavam associadas com atipia cervical e neoplasias cervicais. Em estudos com neoplasia cervical, a soropositividade de *C. trachomatis* foi um significante fator de risco para carcinoma in situ na Espanha e na Colômbia, quando combinada com DNA de HPV[17].

As manifestações clínicas da infecção pelo HPV devem ser pesquisadas durante a avaliação pré-natal rotineira, sobretudo através de exame ginecológico minucioso, seguindo-se de colheita de colpocitologia oncológica. O rastreamento da infecção clamidiana é de fundamental importância, pois caracteriza-se por ser assintomática ou ter sintomatologia branda[19] além de no Brasil, estima-se que cerca de 25% das mulheres estejam contaminadas pelo Papilomavírus Humano[21].

As indesejáveis complicações pré-natais que vêm sendo associadas às infecções do TGI durante a gestação, exigem do obstetra uma conduta ativa no sentido de rastreá-las nessa fase de vida da mulher[1,2].

1.1. Papiloma Vírus Humano

No início os papilomavírus foram agrupados juntamente com os polyomavirus formando a família Papovaviridae. Tal classificação deveu-se a características comuns aos vírus nela incluídos, tais como pequeno tamanho, vírus não envelopados, capsídio icosaédrico (Figura 1), genoma contendo dupla fita de DNA circular e o núcleo como local de replicação e montagem das partículas. Como os papilomavírus são ligeiramente maiores que os polyomavírus (55nm contra 45nm), eles foram divididos em gêneros distintos dentro da mesma família. Posteriores estudos mostraram que há diferenças fundamentais entre a organização do genoma de ambos os grupos, além de outras diferenças importantes. Devido a essas descobertas, os pesquisadores classificaram os Papilomavírus em uma família separada. Atualmente os papilomavírus são classificados como pertencentes à Família Papillomaviridae e ao Gênero *Papilomavírus*.

Os papilomavírus (PVs) compreendem um grupo de vírus não envelopados, icosaédricos, epiteliotróficos, que induzem o aparecimento de lesões na pele (verrugas) e membranas mucosas (condilomas). Alguns PVs também implicam no desenvolvimento de malignidade epitelial, especialmente câncer da cérvice uterina e outros tumores do trato urogenital[22].

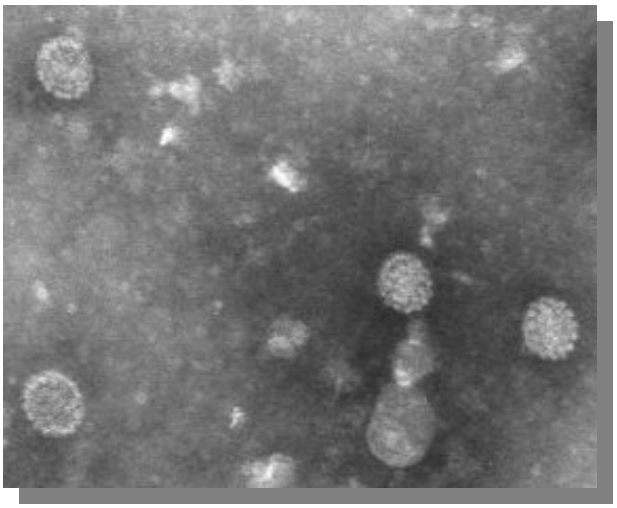

Figura 1 Fotomicrografia eletrônica de HPV[22].

1.1.1. Histórico

Verrugas são conhecidas desde a Grécia antiga e Roma. Sua natureza infecciosa era reconhecida, porém até o século XIX, verrugas genitais eram normalmente consideradas uma forma de sífilis ou gonorréia. A natureza viral das verrugas humanas foi demonstrada no começo dos anos 90, nos quais filtrados livres de células, retirados de lesões mostraram transmitir a doença. Embora alguns tipos de PV's tenham sido identificados em várias espécies de vertebrados, incluindo humanos, a maioria dos PV´s são espécie específicos para seus hospedeiros.

O primeiro papilomavírus animal foi descrito em meados dos anos 30 por Richard Shope, que identificou e caracterizou a natureza transmissiva dos papilomas que cresciam em caudas de coelhos. Esse HPV, agora designado "*cottontail rabbit papillomavirus*" (CRPV), foi o primeiro vírus de DNA causador de tumor a ser identificado. Com o advento de técnicas de clonagem molecular nos anos 70, fomentaram as pesquisas para HPV's[22].

1.1.2. Agente infeccioso

As partículas do papilomavírus humano medem aproximadamente 55nm de diâmetro, tem a forma icosaédrica e não são envelopados. Replicam-se no núcleo de células epiteliais escamosas. Tais partículas possuem densidade de 1.34 g/ml em cloreto de césio e coeficiente de sedimentação (S_{20}, W) de 300. Seu genoma é composto por uma fita dupla de DNA circular. O DNA viral é associado com proteínas "*histone-like*",

possuindo aproximadamente 8000 pares de bases e é encapsulado por 72 capsômeros. Esses existem em dois estados: um capaz de fazer contato com seis vizinhos, como observado em 60 hexavalente capsômeros, e outro com 5 vizinhos em 12 capsômeros pentavalentes.

O capsídio consiste em duas proteínas estruturais. Sua maior proteína (L1), possui aproximadamente 55 Kd de tamanho e representa aproximadamente 80% das proteínas virais totais. A menor proteína (L2) tem tamanho aproximado de 70 Kd.

Uma característica da organização do genoma viral é que todas as *ORFs* (regiões transcricionais) estão localizadas em uma fita de seu DNA. Outros estudos mostraram que apenas uma das fitas serve de modelo para a transcrição. O genoma dos PVs possui aproximadamente 10 *ORFs,*que podem ser divididos em três regiões: a região longa de controle (LCR), correspondendo a aproximadamente 10% do genoma, a região precoce (*E-early*) e a região tardia *(L-late*). Os genes da região *L* codificam proteínas estruturais, a região *E* possui genes principalmente para funções regulatórias como regulação do DNA e ativação do ciclo lítico. Hoje são conhecidos mais de cem tipos de HPV, sendo que grande parte deles está relacionada com neoplasias[22] .

As regiões *L1* e *L2* codificam proteínas do capsídeo e estão expressas apenas em células infectadas com alto metabolismo.

Os genes *E5, E6* e *E7* codificam proteínas relacionadas a funções de estimulação do crescimento. O gene *E5* localiza-se na extremidade 3´ terminal da "*early region*". As proteínas codificadas por esse gene são extremamente hidrofóbicas e localizam-se entre a bicamada lipídica das membranas celulares. Elas interagem com os domínios transmembrana dos receptores das quinases, alterando suas funções. Os genes *E6* e *E7* estão posicionados na extremidade 5´ da "*early region*" e são expressos na forma de RNA mensageiro (mRNA) transcrito da região promotora *E6/E7*. As duas regiões são separadas por uma curta distância**.** As proteínas codificadas pelo E6 estão associadas à degradação do gene p53, gene supressor tumoral, induzindo a degradação do mesmo, sendo tal gene essencial para o ciclo lítico da célula[22](Figura 2).

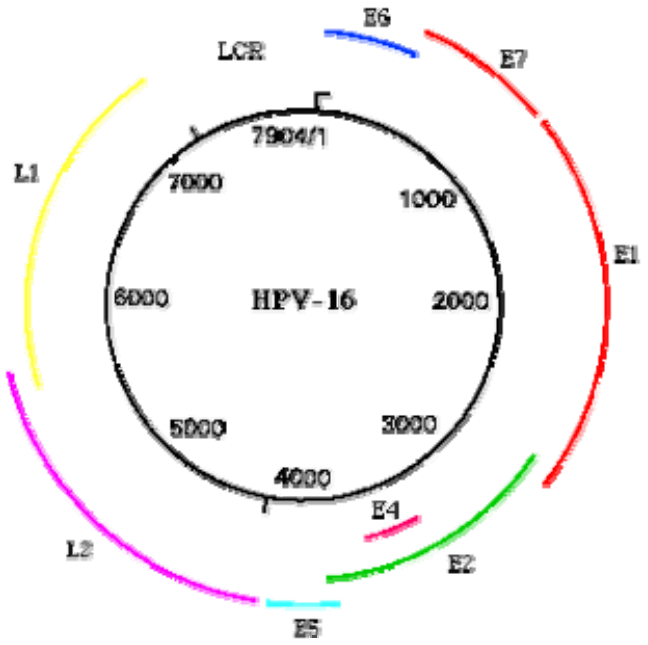

Figura 2 Desenho esquemático do genoma do HPV. Pode-se identificar as três regiões: Região Longa de Controle (LCR), Região Precoce (E1 a E8) e Região Tardia (L1 e L2)[22]

1.1.3. Replicação

1.1.3.1. Adesão, entrada e desnudamento

O primeiro passo da infecção viral se dá quando a partícula viral adere à superfície da célula hospedeira. Essa adesão celular é mediada por vários tipos de receptores. Um dos receptores identificados é a proteína α_6 integrina, bem como um complexo com a β integrina fomando α6β1 integrina ou α6β4 integrina que está presente em uma grande variedade de células. Estudos apontam que o complexo α6β4 é onde se encontra a maior quantidade de partículas virais aderidas. Apesar de esse complexo ser importante, não é imprescindível para a adesão viral, uma vez que células que não apresentam tal complexo podem ser infectadas pelo vírus. Os papilomavírus também podem aderir à heparina e glicosaminoglicanas de queratinócitos humanos.

1.1.3.2 Regulação da transcrição, promotores e expressão

A replicação dos papilomavírus humanos é complexa, uma vez que utiliza vários promotores a fim realizar *splicings* alternativos e múltiplos para a produção de mRNAs. A Figura 3 esquematiza mRNAs num genoma viral.Uma diferença entre as estruturas dos mRNAs de *E6* e *E7* fará com que os HPVs se diferenciem entre alto e baixo risco (baseado com o risco de malignidade da progressão das lesões na cérvice). Para os de alto risco, como o HPV-16, um promotor simples (P_{-97} no caso) direciona a síntese do mRNA com as regiões *E6* e *E7* inteiras, ou com *splicing* em *E6*. Já para os mRNAs de HPVs de baixo risco, como o HPV-6, são expressos por dois promotores independentes.

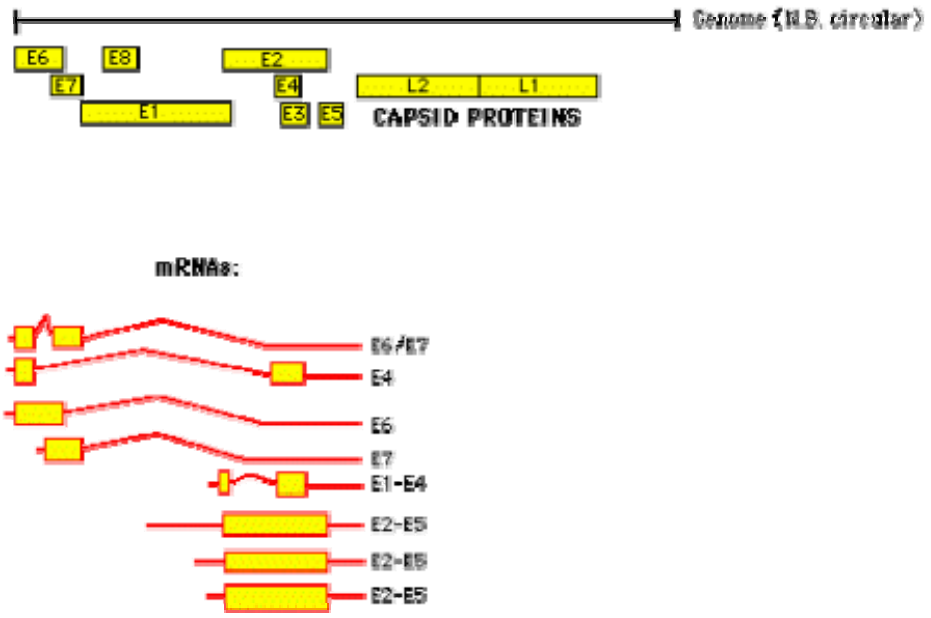

Figura 3 Mapa de transcrição do HPV. A linha preta indica o genoma viral. Em amarelo vê-se as *ORFs*. Mais abaixo, nas linhas vermelhas ligadas às caixas amarelas temos exemplos de mRNA gerados por *splicings* alternativos[22]

Uma importante região para a regulação da transcrição é a *LCR*. Tal região contém elementos que são responsivos a fatores celulares bem como fatores que regulam a transcrição. Esses elementos são de suma importância para a expressão inicial de genes após a infecção viral, podendo ser importante para a manutenção da latência viral.

Os produtos dos genes *E2* são importantes reguladores da transcrição e replicação viral. Uma das proteínas de *E2*, *E2TA* pode funcionar como transativador ou repressor dependendo do local de sua ligação. Estudos mostram que a expressão de genes da região *early* está sob o controle dos produtos do gene *E2*.

As funções relativas à expressão dos genes da região l*ate,* tais como síntese do DNA viral, síntese de proteínas do capsídeo e montagem do vírus, ocorrem exclusivamente em queratinócitos diferenciados. Para cada um dos tipos de HPV há um promotor específico, o qual se torna ativo em queratinócitos diferenciados terminais. Tanto o gene *L1* como o *L2* são expressos dos mRNAs transcritos de Pl (*late promoter*). A expressão dos genes *L1* e *L2* também são reguladas em um nível pós transcricional, através de elementos cis-ativadores.

O *ORF E4* está localizado na região *early* e é expresso como gene *late*, através de um *overlap* em *E2* em uma região diferente de leitura, codificando uma proteína com uma sequência de aminoácidos completamente diferente. A transcrição viral formada por *splicing* de poucos códons do início de *E1* a *E4* parece ser o maior RNA envolvido em lesões HPV induzidas. Nos papilomas, as proteínas de *E4* são expressas primeiramente em diferentes camadas de diferenciação do epitélio, e as proteínas são expressas em células nas quais a replicação do DNA viral é contínua. A expressão de *E4* não é coincidente com as proteínas do capsídeo, sendo que sua expressão precede a de *L1*.

Com relação à liberação do HPV, partículas virais podem ser vistas na camada granular do epitélio e não em níveis mais baixos.

1.1.3.3. Replicação viral

Os papilomavírus possuem três modos de replicação de DNA. O primeiro ocorre durante a infecção inicial em queratinócitos basais, quando há amplificação do genoma viral entre 50 e 100 cópias. A próxima fase é uma manutenção do genoma, que ocorre em células basais em divisão da porção inferior da epiderme bem como em fibroblastos da derme, formando estruturas chamadas de fibropapilomas. Nestas células o DNA viral é mantido como um plasmídeo estável. O genoma viral replica na taxa de uma vez por célula durante a fase S em sincronia com o cromossomo celular hospedeiro, podendo ser carregado junto com as células filhas. Este tipo de replicação de DNA permite a persistência e a latência da infecção em células tronco da epiderme. O terceiro

tipo é a replicação vegetativa do DNA, o qual ocorre nas mais diferenciadas células epiteliais do papiloma. Na forma de plasmídeo o número de cópias permanece constante por muitas gerações de células[22].

Estudos têm revelado que a replicação do plasmídeo requer a expressão dos genes *E1* e *E1*, porém apenas o segundo está diretamente envolvido, tendo o *E2* papéis auxiliares.

No estágio intracelular inicial da infecção, o genoma viral pode permanecer em amplificação por pouco tempo, havendo então a transição para o estágio de manutenção no qual o plasmídeo replica numa taxa de uma vez por ciclo.

A replicação vegetativa é necessária para gerar os genomas que serão montados para formas os virions, um processo que normalmente só ocorre nas células diferenciadas do papiloma[22].

1.1.3.4. Transformação e imortalização

Vários estudos mostram que os HPVs de alto risco, como o HPV-16 e o HPV-18 são considerados *transformation positive*, ou seja, são capazes de induzir transformações celulares, ao contrário dos de baixo risco. As *E6* e *E7 ORFs* estão diretamente envolvidos nessa transformação, como por exemplo o *E7*, juntamente com o oncogene *ras*, que podem levar células primárias de rato a completa transformação.

Os HPVs de alto risco também são capazes de imortalizar células de cultura primária de fibroblastos humanos, keratinócitos humanos de pele e células cervicais epiteliais humanos. Tais células não são ancoragem-dependentes nem tumorigênicas, porém apresentam propriedades de crescimento alteradas e são resistentes a sinais de diferenciação terminal. Todos os tipos de HPVs genitais são capazes de induzir proliferação celular, porém apenas os de alto risco são capazes de estender a vida das células e levá-las à imortalidade.

Um dos responsáveis por esses dois processos de transformação e imortalização é a oncoproteína *E5*, que é encontrada no complexo de Golgi, endossomos e em algumas membranas celulares. A *E5* pode associar-se a uma subunidade da ATPase vacuolar e inibir a acidificação dos endossomos. Porém como a *E5* não é expressa na maioria dos cânceres HPV positivos, acredita-se que não estimule proliferação celular.

Para que o corra a imortalização celular é necessária uma associação entre *E6* E *E7*. Estudos demonstram que a *E6* forma um complexo e funcionalmente inativa o

produto do gene supressor tumoral *p53*, o qual desempenha papel fundamental no crescimento celular e na supressão tumaral, levando uma célula com problemas irreparáveis à apoptose. Há suspeitas também que altos níveis de proteínas *E6* aceleram a degradação do *p53*.

A oncoproteína *E7* pode transativar o promotor de *E2* induzindo a síntese de DNA em células quiescentes e cooperar com o oncogene *ras* para transformar células primárias.

Sabe-se também que a *E7* liga-se com proteína retinoblastoma, a qual tem porções homólogas à *E7*. Tal proteína regula o ciclo celular. Essa adesão leva à uma hipofosforilação tornando a proteína inativa. Esse evento pode estar ligado à proliferação celular[22].

1.1.4. Infectividade

Dentre os tipos de HPV conhecidos, o HPV 16 em cerca de 85,0% das infecções está fortemente associado com neoplasia intra-cervical, o HPV 18 está associado com câncer (particularmente adenocarcinomas e carcinomas de células pequenas indiferenciadas), mas pode aparecer em lesões precursoras de baixo grau. A integração do genoma do HPV 18 é fortemente associada com carcinomas invasivos, em contraste com a doença intra-epitelial[23].

Cerca de 85% das lesões de condiloma acuminado contém os HPV tipos 6 ou 11, ou ambos, porém podem ser encontrados os tipos 16,18,30,31,34 e 35[24] .

A infecção pelo HPV se dá pelo contato minimamente traumático e direto da pele ou mucosas infectadas, sendo que o vírus se replica exclusivamente no núcleo das células dos epitélios (epiteliotrófico), desencadeando inflamação mínima, o que pode justificar a sua dificuldade de imunização[22]

1.2. *Chlamydia trachomatis*

Responsável por aproximadamente 50 milhões de casos novos por ano, a infecção clamídiana é a DST bacteriana mais freqüente em muitos países, tendo prevalência geral em torno de 15%[25,26]. Em estudo para determinar a prevalência e os fatores de risco para clamídia[27], os autores verificaram que essa infecção tem índice de prevalência de 7,1%, dos quais 63% são completamente assintomáticos.

Na gravidez, a prevalência de *C. trachomatis* varia de 2 a 47%[28]. Em gestantes brasileiras os dados são escassos e a prevalência encontrada, muito variável, entre 2 e 30%[27-30].

Gravett et al[31] associaram a infecção clamidiana com RPM, TPP e baixo peso fetal, apesar de não terem investigado a presença de anticorpos IgM anticlamydia. Sweet et al[32] encontraram taxas de prematuridade e RPM significativamente maiores no subgrupo de mulheres infectadas que tinham IgM anticlamydia positivo.

A *C. trachomatis* causa em humanos tracomas, doenças oculares, pneumonia infantil e o linfogranuloma venéreo (LGV).

1.2.1. Classificação

As clamídias são micro organismos pertencentes ao Filo Chlamydiae, à Ordem Chalmydiales, à Família Chlamydiaceae e ao Gênero Chlamydia, o qual compreende quatro espécies: *C. trachomatis, C. psittaci, C. pneumoniae e C. pecorum.* Somente as três primeiras são associadas à infecções humanas. A *trachomatis* é subdividida em dois biótipos: tracoma e LGV (linfogranuloma venéreo). O biótipo tracoma contém 13 sorotipos (A, B, Ba, C-K) e o LGV, 3 (L1, L2 e L3)[33].

1.2.2. Aspectos estruturais e fisiológicos

As clamídias são bactérias que medem de 0,2 a 0,8 μm de diâmetro, transportando um cromossomo de 1.000 Kb, capaz de codificar em torno de 600 proteínas. As suas células possuem membrana externa e interna, a primeira é semelhante à das bactérias Gram-negativas. O que falta nas clamídias é a camada de pepitídeo-glicano, embora os genes que a codificam estejam presentes no genoma[33].

As clamídias apresentam um ciclo de desenvolvimento bifásico e, por esta razão, existem em duas formas celulares, conhecidas como corpúsculo elementar e corpúsculo reticular. O corpúsculo elementar é a forma extracelular infecciosa e o reticular, a forma intracelular não infecciosa[33].

São parasitas intracelulares obrigatórias, devido, principalmente à sua incapacidade de gerar ATP, dependendo assim, do ATP celular, sendo consideradas parasitas de energia celular[33].

1.2.3. Fatores de virulência, ciclo celular e patogênese

Os fatores de virulência das clamídias estão ligados ao ciclo de desenvolvimento celular destas bactérias, o qual é em três fases: internalização, proliferação/diferenciação e saída. A internalização da bactéria pelas células do organismo provavelmente ocorre por vários mecanismos, mas a forma infecciosa é sempre o corpúsculo elementar. A fase de proliferação/diferenciação ocorre no fagossoma que se forma após a internalização da clamídia. Esse não funciona como lisossomo ficando assim, a bactéria protegida. No fagossoma, o corpúsculo elementar transforma-se em corpúsculo reticular e este, ao proliferar, em corpúsculo elementar. Os mecanismos dessas transformações não são muito bem esclarecidos. Após algumas horas de proliferação, a célula hospedeira rompe-se, os corpúsculos elementares são lançados no espaço extracelular. E tem início outro ciclo celular (Figura 4).

As infecções por clamídia são acompanhadas de resposta imune humoral e celular com a produção de anticorpos contra o LPS e a proteína MOMP e envolvimento de células CD4 e CD8. A ativação das células Th1 apresenta boa correlação com o desenvolvimento de imunidade e a ativação de Th2 com o desenvolvimento de infecção crônica [33].

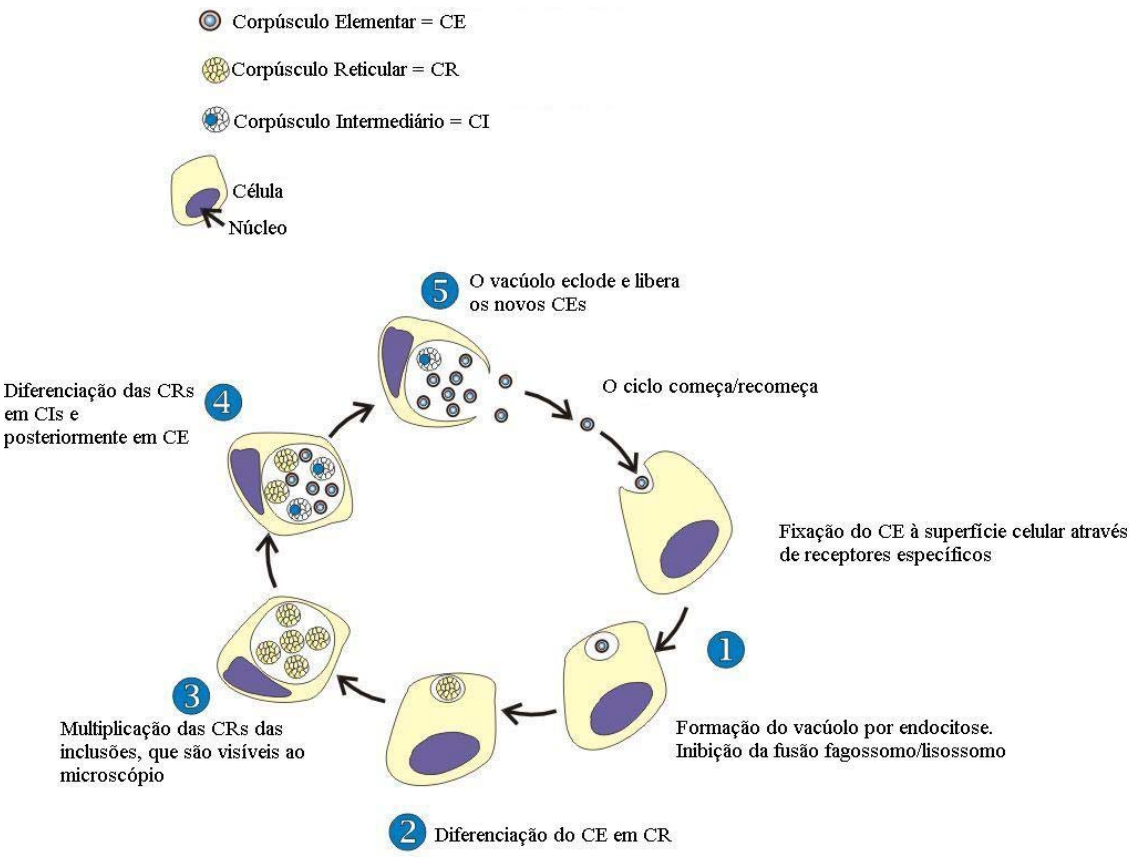

Figura 4 Ciclo celular da *Chlamydia trachomatis.* Em 1 temos a formação do vacúolo, diferenciando-se em 2. Em 3 temos a multiplicação dos corpúsculos, tonando-se visíveis no microscópio. Em 4 ocorre nova diferenciação e em 5 ocorre a liberação das partículas.Modificado de: http://pedagogie.ac-montpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/documents/chlamydia_cycle.jpg

Considerando as graves implicações da infecção clamidiana sobre o binômio materno-fetal bem como a alta incidência de doença HPV induzida nas gestantes, esse trabalho se justifica.

2. Objetivo

O objetivo desse trabalho é avaliar a relação de infectividade existente entre HPV e *Chlamydia trachomatis* em gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzidas.

3. Casuística e Métodos

3.1. Gestantes

Foram incluídas no estudo 128 gestantes atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais em Obstetrícia (AIG), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de junho de 2004 a julho de 2005. Foram excluídas do estudo gestações múltiplas, gestantes com hipertensão, diabetes, patologias do colágeno, AIDS, tireoidopatias, doenças hematológicas e que estavam em vigência de antibióticoterapia, ou tiveram realizado tratamento de infecções do trato genital em período inferior a 30 dias.

Todas as gestantes apresentavam lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzida no momento da inclusão no estudo e a idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e por exame ultra-sonográfico precoce, ou seja, até 20 semanas de gestação.

Todas as gestantes incluídas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido tendo sido o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, tendo o número de protocolo 337/2005 – CEP, de acordo com a portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

3.2. Colheita das Amostras

Durante o exame especular, empregando-se o espéculo bi-valvo de Collins esterilizado e isento de qualquer lubrificante, foi colhida a secreção cervical com *cytobrush* para pesquisa de *C. trachomatis* e conteúdo vaginal do terço médio da parede lateral da vagina para avaliação da microbiota vaginal corado pelo método de Graam. A seguir o raspado da lesão cervical da lesão sugestiva de doença HPV induzida foi acondicionada em frascos de polipropileno de 15 mL esterilizado, com tampão Tris Edta Tween (TET) e mantido a –70ºC até o momento do processamento. As lesões que foram submetidas à biópsia para confirmação histopatológica foram acondicionados em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL esterilizado, com tampão Tris Edta (TE) e mantido a –70ºC até o momento do processamento.

A presença de *Chlamydia trachomatis* foi avaliada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para o HPV, foram empregadas as técnicas de PCR e tipagem por sequenciamento.

A análise da microbiota vaginal, a colpocitologia oncótica tríplice bem como as biópsias de vulva e vagina foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. A detecção e tipagem dos HPVs bem como a pesquisa de *C. trachomatis* foram realizadas no Laboratório de Virologia Humana e Animal, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, Botucatu.

3.3. Pesquisa de HPV e *Chlamydia trachomatis*

3.3.1. Extração do ácido nucléico

A digestão da lesão sugestiva de doença HPV induzida bem como da secreção cervical realizou-se pela adição de *Proteinase K,* na concentração de 400 μg/mL conforme recomenda o fabricante, sendo posteriormente incubado a 56ºC. Após esse período, inativou-se a proteinase K através de aquecimento a 96ºC durante 7 minutos.

Após a digestão do material, foram adicionados 100 μl de uma solução de NaCl 5M. Em seguida, 100μl de uma solução CTAB/NaCl[34] pré-aquecida a 65°C foi adicionada, com posterior incubação por 10 minutos a 65ºC. Após a incubação acrescentou-se 750 μl de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 centrifugando em seguida por 5 minutos 13.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionados 450 μl de etanol absoluto a - 20ºC com posterior incubação por 10 minutos à -20ºC. Em seguida, o material foi centrifugado por 15 minutos, 13.000 rpm à 4ºC, o sobrenadante descartado e acrescentado 450 μl de etanol 70% a 8ºC. Após centrifugação por 20 minutos, 13.000 rpm à 4ºC, o álcool foi descartado e as amostras colocadas em dessecador com sistema à vácuo por 30 minutos, sendo em seguida ressuspensas em 50 μl de tampão TRIS/EDTA (TE) para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de PCR e tipagem por sequenciameno.

3.3.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para a pesquisa de Papilomavírus humano, em todas as reações de PCR, foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL (Axigen®) em volume total de 25 uL de master mix. Esse máster mix foi composto de 1X PCR Buffer 10x (Invitrogen); 0,4mM

de DNTP mix ; 1U de Taq DNA Polimerase (Platinum, Invitrogen); 0,5uM de cada *primer* GP5+ (TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC) e GP6+ (GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT)[18,35,36]; 16,50 uL de água Milli-Q autoclavada (Milli Q Plus, Milipore) e 2 uL da amostra de DNA. A incubação será realizada em termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 94ºC durante 5 minutos e 94ºC durante 1 minuto para desnaturação, 55ºC durante 1 minuto para anelamento dos *primer*s e 72ºC durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 20 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final será de 72ºC pro 10 minutos e resfriamento a 4ºC. Em todas as reações realizadas será utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água Milli-Q.

Para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis,* em todas as reações de PCR, foram utilizados tubos de microcentrifuga de 0,5mL (Axigen) em volume total de 25,0uL de master mix. Esse máster mix foi composto de 1X de PCR Buffer 10x (Invitrogen); 2mM de $MgCl_2$, 0,8mM de DNTP mix; 1U de Taq DNA Polimerase; 0,5µM de cada *primer* CTP1 (TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA) e CTP2 (TTC CCC TTG TAA TTC GTT GC)[37]; 14,0uL de água Milli-Q autoclavada (Milli Q Plus, Milipore) e 2µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycle (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 95ºC durante 5 minutos e 95ºC durante 1 minuto para desnaturação, 55ºC durante 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72ºC durante 1 minuto e 30 segundos para extensão, seguido de mais 39 ciclos idênticos ao descrito. Por último, a temperatura de extensão final foi de 72ºC por 5 minutos e resfriamento a 4ºC. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada.

3.3.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL) preparada em tampão 1X TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) e corado com Brometo de Etídio (Gibco BRL). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 123 pb (Gibco BRL) e posteriormente fotografados utilizando-se analisador de imagens com transluminador UV (Aplha Innotech®) e os resultados analisados utilizando-se o *software* Alpha Ease® FC.

3.3.4. Controle de extração através da amplificação do gene da β-globina[38]

Para monitorar a extração das amostras foi realizada, após cada etapa de extração, uma PCR de um gene constitutivo, a β-globina, segundo os parâmetros a seguir:

Para as reações de PCR, foram utilizados tubos de microcentrifuga de 0,5mL (Axigen) em volume total de 25,0uL de master mix. Esse máster mix foi composto de 1X de PCR Buffer 10x (Invitrogen); 2mM de $MgCl_2$, 0,8mM de DNTP mix; 1U de Taq DNA Polimerase; 0,5μM de cada *primer* PCO4 (CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC) e GH20 (GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC)[38]; 14,0uL de água Milli-Q autoclavada (Milli Q Plus, Milipore) e 2μL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycle (Eppendorf) empregando-se os parâmetros de 95ºC durante 9 minutos e 95ºC durante 1 minuto para desnaturação, 55ºC durante 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72ºC durante 1 minuto para extensão, seguido de mais 39 ciclos idênticos ao descrito. Por último, a temperatura de extensão final foi de 72ºC por 5 minutos e resfriamento a 4ºC. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água Milli-Q autoclavada (Bouer HM, 1991).

3.4. Tipagem de HPV por sequenciamento

Para as reações de sequenciamento foi utilizado sequenciador automático ABI Prism 377 (Amersham).

As amostras positivas para DNA de HPV foram armazenadas em freezer –20°C e posteriormente, em sala previamente esterilizada por luz ultra-violeta, foi realizada uma PCR com os primers MY09 (CGT $CC_{A/C}$ $AA_{A/G}$ GGA $_{A/T}$AC TGA TC) MY11 ($GC_{A/C}$ CAG $GG_{A/T}$ CAT $AA_{C/T}$ AAT GG)[39].

Após essa etapa, realizou-se a purificação do DNA das amostras utilizadas com o Kit GFx (Amersham), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. A seguir os purificados foram quantificados em gel de agarose 1,5% corado com *Brometo de Etídeo*, utilizando-se como referência o marcador Low Mass Ladder (Amersham). As concentrações de DNA utilizadas seguiram recomendações do fabricante do reagente de sequenciamento (Amersham).

Após a purificação e posterior quantificação, a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit Dyenamic ET terminators (Amersham) conforme o protocolo: 2,0μL do mix Dyenamic, 1,0μL de cada *primer*, na concentração de 2,5pmol/μL e H_2O

Milli Q autoclavada q.s.p. para 10µL. A concentração de DNA na reação variou conforme sua concentração na quantificação em gel de agarose, no intervalo de 1 a 7 µl.

Os parâmetros de ciclagem utilizados foram os recomendados pelo fabricante do *kit*, sendo 25 ciclos compostos por 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Após o término da reação, o DNA foi precipitado e posteriormente ressuspenso seguindo o protocolo do fabricante.

Os resultados foram comparados com seqüências existentes na Home Page do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Realizou-se um *Blast* para cada uma delas e adotou-se identidade mínima de 85% entre a seqüências estudadas e as existentes em tal site. Amostras com identidade abaixo da estipulada foram desconsideradas. Posteriormente as fitas sense e anti-sense foram alinhadas utilizando-se o software Mega 3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), avaliando a complementaridade entre ambas, comparando-se também com a seqüência do gene todo que foi amplificado.

3.5. Cultura de células HeLa como controle positivo das PCR's

Essa cultura de células foi necessária para que, a partir da extração do DNA, tivéssemos DNA de HPV para ser utilizado como controle positivo das reações. HeLa são células de carcinoma de colo uterino, com DNA de HPV 18 integrado no genoma.

Em uma garrafa de 25 cm^3 foram preparados 10,00 mL de meio de cultura contendo 8,00 mL de MEM (Meio Essencial Mínimo contendo 1% de Aminoácidos não essenciais e 0,1g/L de L-glutamina) com 10% de soro fetal bovino. Células HeLa de várias linhagens mantidas congeladas em nitrogênio líquido, foram descongeladas rapidamente através da imersão em água previamente aquecida à 37°C, e colocadas no meio de cultura. Após esse processo, preparado em capela de fluxo laminar, previamente esterilizada por luz ultra-violeta, com materiais estéreis, as células são mantidas em estufa BOD à 37°C, até a garrafa apresentar, ao microscópio óptico, uma confluência de aproximadamente 100%, para que se realiza a extração de DNA.

Para a extração do DNA utilizamos DNAzol® com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer – 20°C até o momento da utilização como controle das reações.

3.6. Cultivo de *Chlamydia trachomatis*

Nesse experimento, foram utilizadas células McCoy, de fibroblastos de camundongos. Tais células foram cultivadas em meio D-MEM (*Mediun essential Minimum)*, com 0,5µg/mL de cyclohexamida e 25µg/mL de vancomicina, com 10% de soro fetal bovino. Após o preparo do meio, as células, que estavam congeladas em nitrogênio líquido, foram descongeladas rapidamente através da imersão em água previamente aquecida a 37°C. Posteriormente foram mantidas em estufa BOD até atingirem uma confluência celular de aproximadamente 60%. Foram então inoculados 500µL de uma suspensão de clamídias em meio de cultura. Posteriormente as garrafas contendo as bactérias recém inoculadas foram centrifugadas a 3.100 g, a 35°C por 60 minutos. Após esse período, as garrafas foram mantidas por 72 horas em estufa BOD[40] . Tais garrafas foram monitoradas até que fossem visíveis, em microscópio óptico invertido, corpúsculos de inclusão, indicando infecção das células pelas clamídias (Fig. 4.5.).

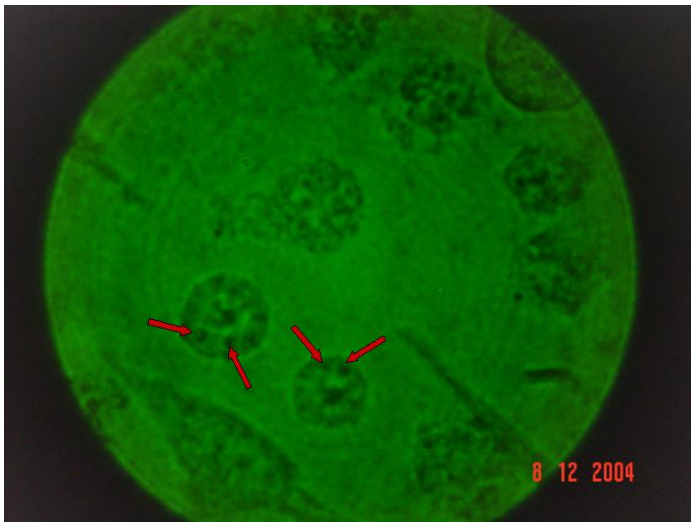

Fig. 3.5. Foto de cultura de células McCoy infectadas por *Chlamydia trachomatis.* As setas vermelhas mostram os corpúsculos de inclusão, indicativos da infecção

4. Resultados

4.1. Prevalência do HPV e *Chlamydia trachomatis*

Nas 128 pacientes incluídas no estudo, a positividade para DNA de HPV foi de 77,3% (Figura 6). Para a *chlamydia trachomatis* a positividade foi de 23,4% (Figura 7), e destas, 22 foram positivas para ambos os agentes. Ainda com relação às amostras, temos 77 positivas apenas para HPV, e finalmente, 21 negativas para ambos os agentes (Tabela 4.1.).

Para todas as análises foram consideradas apenas as amostras que foram positivas para β-globina. As negativas foram excluídas do estudo. Em todas as reações utilizou-se um controle positivo, um controle negativo e um marcador de peso molecular (Figuras 8 e 9).

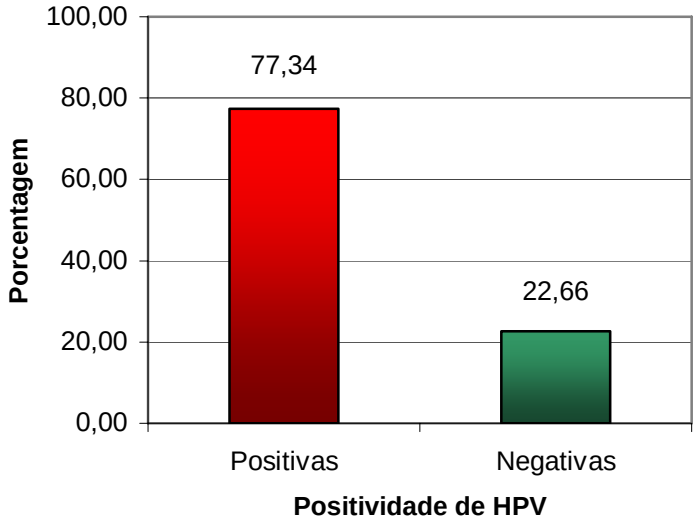

Figura 6 Porcentagem de positividade de DNA de HPV detectadas por PCR nas lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzida.

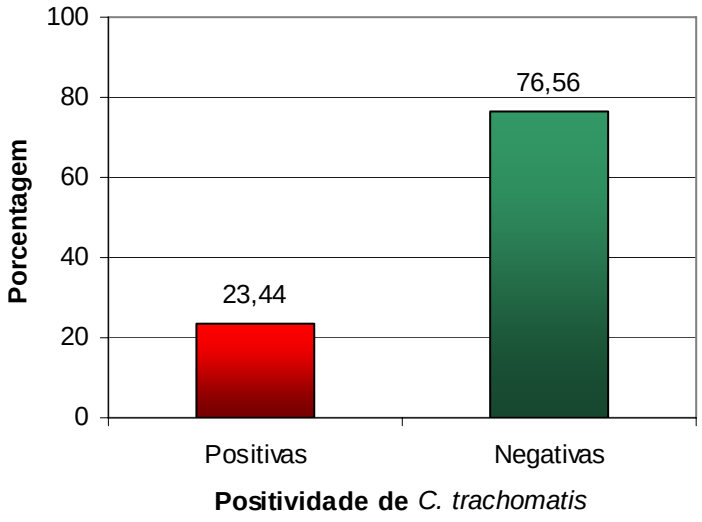

Figura 7 Porcentagem de positividade para *Chlamydia trachomatis* detectadas por PCR nas lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzida.

Tabela 4.1. Relação de positividade entre HPV e *C. trachomatis* nas 128 gestantes incluídas no estudo, atendidas na AIG, no período entre junho de 2004 e julho de 2005. As porcentagens referem-se ao total de pacientes analisadas (128). Temos os totais de positivos e negativos nas linhas. Nas colunas temos os totais de positivos e negativos de HPV. A análise estatística baseou-se no teste de McNemar (X^2=54,4; P<0,001).

	HPV +		**HPV -**		**Total**	
	n	%	n	%	n	%
***C. trachomatis* +**	22	17,19	8	6,25	30	23,44
***C. trachomatis* -**	77	60,16	21	16,41	98	76,56
Total	99	77,34	29	22,66	128	

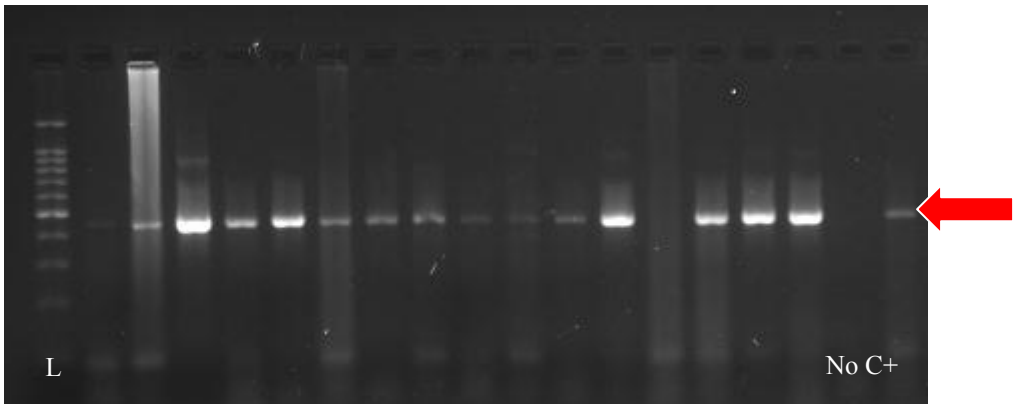

Figura 8 Foto de gel de agarose de amostras de HPV utilizando-se os *primers* MY09/MY11. L indica o *ladder* de 100 pb. A seta mostra altura das bandas positivas de 460 pares de base. Pode-se também ver o controle negativo (No) e o positivo (C+).

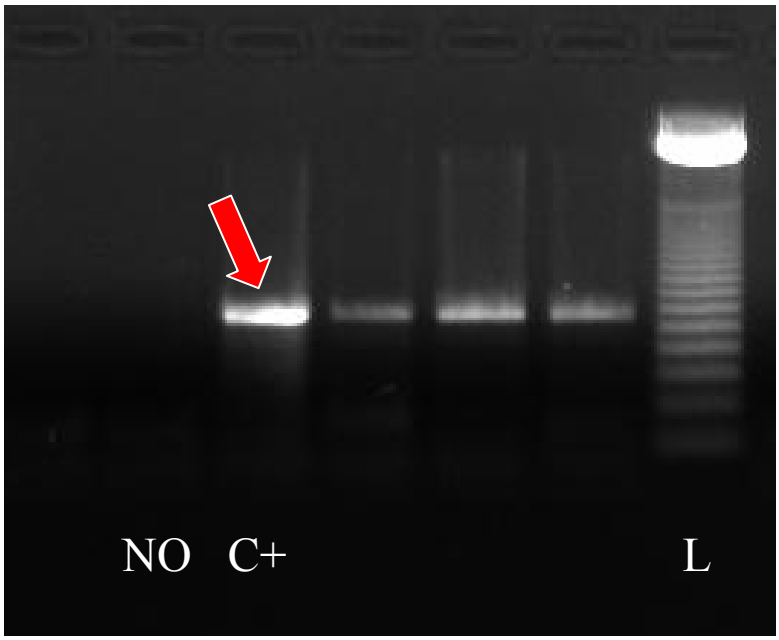

Figura 9 Foto de gel de agarose de amostras de *Chamydia trachomatis*. L indica *ladder* de 50 pares de base. A seta mostra altura das bandas positivas de 260 pares de base. Pode-se também ver o controle negativo (No) e o controle positivo (C+)

Em relação à positividade de HPV nas amostras incluídas no estudo, de acordo com a região genital da coleta, podemos observar que do total de 278 amostras, 193 foram positivas para a presença do DNA de HPV. A maior positividade do DNA de HPV foi na região perianal, seguida da região vaginal e do colo do útero (Tabela 4.2). Podemos ressaltar que em todas as regiões do trato genital analisadas houve significância estatística dos dados apresentados demonstrando relação entre a presença de lesão nas regiões e a presença de DNA de HPV.

Tabela 4.2. Relação entre a região da localização da lesão sugestiva de doença HPV induzida nas gestantes incluídas no estudo e a positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos as regiões de análise das lesões nas pacientes. Nas colunas temos o número total de cada amostra, a positividade para o HPV, a positividade de *C. trachomatis* e os valores da análise estatística (teste Z).

		HPV positivo		HPV negativo		Estatística	
Região da coleta	Total	n	%	n	%	z	p
Vagina	67	49	73,13	18	26,87	5,12	p<0,001
Vulva	88	54	61,36	34	38,64	2.77	p=0,006
Colo	119	86	72,27	33	27,73	6.81	p<0,001
Perianal	4	4	100,00	0	0,00	2.12	p=0,034
Total	278	193	69,42	85	30,58	8,87	p<0,001

Quando o parâmetro utilizado para a comparação com a detecção do DNA de HPV foi o método anticoncepcional (Tabela 4.3.), um total de 128 amostras foi avaliado. Em relação às mulheres que fizeram o uso de contraceptivo oral ,45 amostras de, 30 (66,67%) foram positivas para HPV e 13 (28,89%) para clamídia. Das 34 amostras de pacientes que não utilizaram nenhum método contraceptivo, 22 (64,71%) foram positivas para HPV e 7 (20,59%) para clamídia. Com relação à análise estatística, encontramos diferença significativa apenas nas pacientes que utilizaram o contraceptivo oral ou que não utilizaram um método contraceptivo. Nestes dois casos a incidência de HPV se mostrou maior que a de clamídia.

Tabela 4.3. Relação do método anticoncepcional utilizado pelas pacientes e positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos o método contraceptivo utilizado pelas pacientes. Nas colunas temos as positividades para HPV, para *C. trachomatis* e os valores da análise estatística (teste Z).

Método anticoncepcional	Total	Positividade de HPV		Positividade de clamídia		Estatística	
		n	%	n	%	z	p
Preservativo	28	16	57,14	8	28,57	1.846	P= 0.065
Pílula	45	30	66,67	13	28,89	3.397	P= <0.001
Laqueadura	2	2	100,00	0	0,00	1.000	P= 0.317
Nenhum	34	22	64,71	7	20,59	3.419	P= <0.001
Não Avaliado	19	18	94,74	2	10,53		
Total	128	88	68,75	29	22,66	7.258	P= <0.001

Na tabela 4.4. encontra-se a comparação da idade das pacientes em relação à positividade para HPV. Das 128 amostras avaliadas a mediana de idades foi de 22 anos (14-47). As faixas etárias compreendidas entre 15 a 40 anos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação às positividades de HPV e *C. trachomatis* (Tabela 4.4), ou seja, para as faixas etárias que apresentaram resultados significativos, há uma maior incidência de HPV do que de *C. trachomatis*.

Tabela 4.4. Relação da idade das pacientes com a positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos a faixa etária das pacientes. Nas colunas temos a positividade para HPV, para *C. trachomatis* e os valores da análise estatíatica.

Idade	Total	Positividade de HPV		Positividade de clamídia		Estatística	
		n	%	n	%	z	p
abaixo de 15	1	1	100,00	0	0,00	0,00	1,00
de 15 a 20 anos	46	28	60,87	17	36,96	2.094	P= 0.036
de 21 a 25 anos	34	27	79,41	4	11,76	5.304	P= <0.001
de 26 a 30 anos	17	13	76,47	3	17,65	3.044	P= 0.002
de 31 a 40 anos	13	9	69,23	1	7,69	2.793	P= 0.005
acima de 40 anos	5	3	60,00	0	0,00	1.380	P= 0.168
Não Avaliado	12	11	91,67	0	0,00		
Total	128	92	71,88	24	18,75	8.389	P= <0.001

A relação do estado civil e positividade para DNA de HPV estão descritas na tabela 4.5. Cento e vinte e oito amostras foram analisadas, dessas 62 (48,4%) mantinham união conjugal, porém 32 eram amasiadas sendo que 21 (65,63%) foram

positivas para HPV e 6 (18,75%) para clamídia, apresentando resultados estatisticamente significativos. Outro grupo a apresentar dados significativos foi o das 51 pacientes solteiras, onde 37 (72,55%) foram positivas para HPV e 16 (31,37%) para clamídia. Nesses casos, houve maior incidência de HPV em relação à clamídia.

Tabela 4.5. Relação do estado civil das pacientes com a positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos o estado civil das pacientes. Nas colunas temos as positividades para HPV, para *C. trachomatis* e os valores das análises estatísticas.

Estado Civil	Total	Positividade de HPV		Positividade de clamídia		Estatística	
		n	%	n	%	z	p
Solteira	51	37	72,55	16	31,37	3.945	P= <0.001
Casada	30	15	50,00	8	26,67	1.565	P= 0.118
Amasiada	32	21	65,63	6	18,75	3.550	P= <0.001
Viúva	1	1	100,00	1	100,00	0	1
Divorciada	1	1	100,00	0	0,00	0	1
Não Avaliado	13	11	84,62	0	0,00		
Total	128	86	67,19	30	23,44	6.490	P= <0.001

Outro parâmetro avaliado foi o número de gestações das pacientes incluídas no estudo. Do total de 128 gestantes, a maior positividade de HPV foi em primigestas (90,0) seguida de multigestas (Tabela 4.6.). Para *C. trachomatis*, as secundigestas foram predominantemente infectadas (32,08%). Em conjunto os dados mostram que as primigestas, secundigestas e tercigestas apresentam maior freqüência de HPV em relação à clamídia.

Tabela 4.6. Relação do número de gestações das pacientes e a presença de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas temos o número de gestação das pacientes. Nas colunas temos as positividades para HPV, para *C. trachomatis* e os valores das análises estatísticas.

Número de gestações	Total	Positividade de HPV		Positividade de clamídia		Estatística	
		n	%	n	%	z	p
Primigestas	10	9	90,00	3	30,00	2.282	P=0,022
Secundigestas	53	36	67,92	17	32,08	3.512	P=<0.001
Tercigestas	23	15	65,22	4	17,39	3.010	P= 0.003
Multigestas	19	9	47,37	4	21,05	1.349	P= 0.177
Não Avaliado	23	20	86,96	2	8,70		
Total	128	89	69,53	29	22,66	7.413	P= <0.001

O rastreamento de mais infecções do trato genital inferior no momento da inclusão das 128 gestantes no estudo também foi realizado. Essa análise nos mostra que 58% das gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida e positividade para DNA de HPV apresenta padrão de normalidade de microbiota vaginal (Flora I). Entretanto as infecções do trato genital inferior como vaginose bacteriana estiveram presente em 53,85% das gestantes com positividade de DNA de HPV (Tabela 4.7.).

Tabela 4.7. Relação de infecção do trato genital inferior e positividade de HPV e *C. trachomatis*. Nas linhas vemos os tipos mais relevantes encontrado de infecções genitais. Nas colunas temos as positividades de HPV e *C. trachomatis* e os valores das análises estatísticas.

Infecção genital	Total	Positividade de HPV		Positividade de clamídia		Estatística	
		n	%	n	%	z	p
Candidíase	21	17	80,95	5	23,81	3.390	P= <0.001
Flora I	38	22	57,89	10	26,32	2.594	P= 0.009
Flora II	4	1	25,00	1	25,00	-0.816	P= 0.414
Vaginose Bacteriana	13	7	53,85	10	76,92	0.821	P= 0.412
Outros	28	5	17,86	2	7,14	0.840	P= 0.401
Não Avaliado	24	23	95,83	1	4,17		
Total	128	75	58,59	29	22,66	5.729	P= <0.001

Do total de 102 amostras tipadas obtivemos os seguintes resultados: 44 (43,14%) amostras foram tipadas como sendo HPV 06, 12 (11,77%) amostras como sendo HPV 11, 08 (7,84%) amostras sendo HPV 16, 46 (45,10%) sendo HPV 18 e 15 de outros vários tipos, sendo HPV's 31, 33, 35, 55, 81 e outros não identificados (fig 4.5.). Desses dados temos sobreposição de resultados devido à infecções mistas, como 9 amostras sendo mistas entre HPV 6 e HPV11; 11 amostras entre HPV 6 e HPV 18; 1 mista entre HPV 11 e HPV 18; 2 mistas para HPV 16 e HPV 18; uma para HPV 18 e HPV 81; uma mista para HPV 18 e um tipo não identificado; uma mista entre HPV 31 e HPV 18 e uma mista entre HPV 6, HPV 11 e HPV 18.

Amostras nas quais a qualidade do resultado do sequenciamento foi baixa e, em decorrência disso, não se conseguiu uma análise segura dos resultados, foram excluídas do estudo em relação ao genotipo. A figura 4.6. mostra uma sequência de bases de boa qualidade onde foi possível se identificar o genotipo viral.

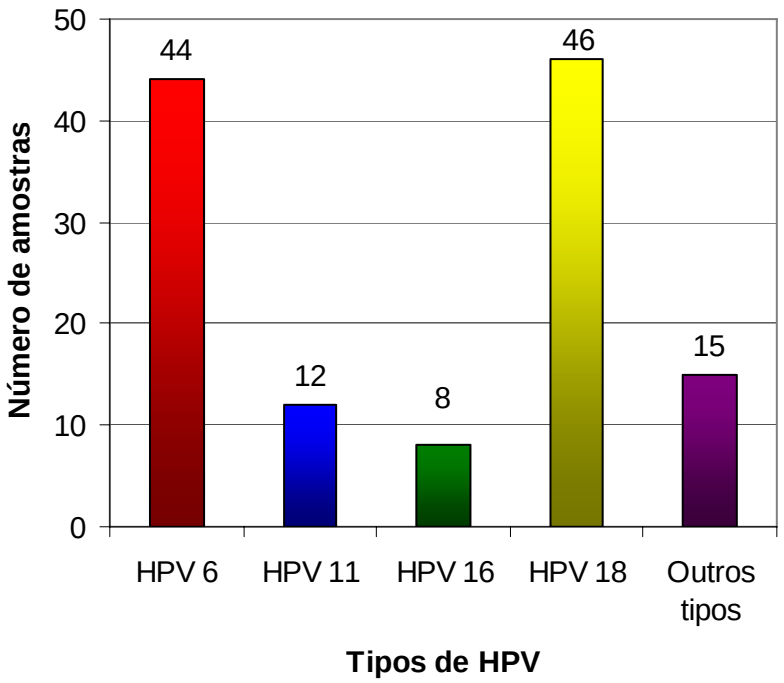

Figura 10 Número de amostras positivas em relação ao genotipo de HPV. Nesta figura estão representados apenas os tipos de HPV individualmente, sem se considerar as infecções mistas, desta forma a soma dos valores é maior que o total de amostras. Em vermelho podemos ver os totais de HPV6, em azul os totais de HPV11, em verde os totais de HPV16, em amarelo os totais de HPV18 em roxo os totais dos outros tipos.

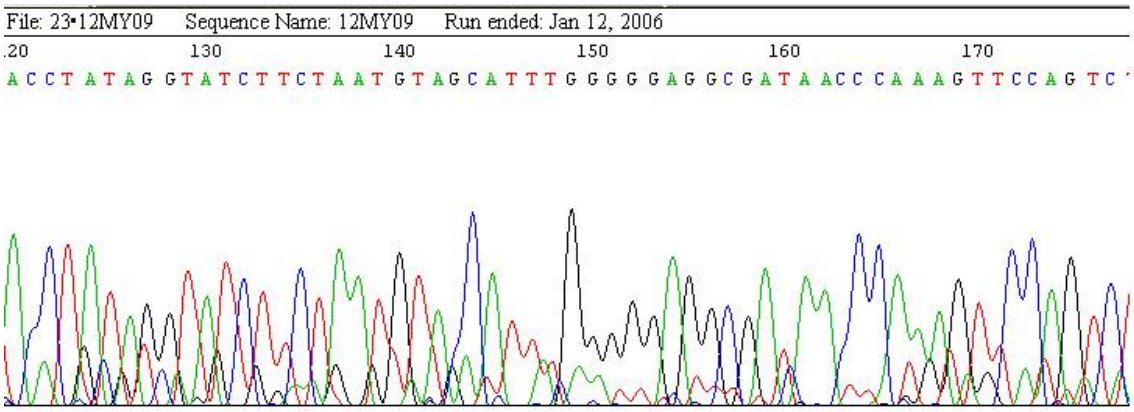

Figura 11 Eletroferograma mostrando sequência de bases do *primer* MY09 de uma das amostras. Cada uma das cores refere-se à uma das bases, sendo adenina em verde, citosina em azul, timina em vermelho e guanina em preto. Os picos mostram a intensidade de cada base no *lócus* específico e sua respectiva intensidade.

Quando associamos a região da lesão nas pacientes ao grau de risco de HPV, observamos que para as 11 amostras tipadas na região vaginal, 100% continha genotipo de alto. Quanto às 23 amostras de região vulvar, 15 (65,22%) foram de alto grau e 12 (52,17%) de baixo grau; com relação às 20 amostras de colo uterino, 12 (60%) foram de alto grau, enquanto 9 (45%) foram de baixo grau; houve uma amostra de região perianal tipada como alto grau (Tabela 4.8.).

Para a região vulvar, 65,2% eram HPV de alto grau e finalmente para o colo uterino 12 amostras (60,0%) continham positividade de DNA de HPV para um genótipo de alto risco oncogênico (Tabela 4.8.).

Tabela 4.8. Relação da região da lesão nas pacientes e os HPVs de alto e baixo graus. Nas linhas temos a região das lesões. Nas colunas temos os números de amostras para alto e baixo riscos.

Região		HPV alto risco		HPV baixo risco	
	Total	n	%	n	%
Vagina	11	11	100,00	4	36,36
Vulva	23	15	65,22	12	52,17
Colo uterino	20	12	60,00	9	45,00
Períneo	1	1	100,00	0	0,00
Total	55	39	70,91	25	45,45

4.2. Sensibilidade das reações

Tanto para as PCRs de HPV como para as de clamídia, realizou-se um teste da sensibilidade da reação. Para isso os controles foram diluídos através de diluições seriadas na razão de 1:10. Partindo-se de uma amostra controle pura, diluiu-se até a razão de 1:10.000.000.

Para o HPV o limiar de detecção encontra-se na diluição 1:1.000.000. Já para a clamídia o limiar de detecção encontra-se na diluição 1:1.000.

4.3. Análise histopatológica das lesões

Os fragmentos de biópsias das lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida, bem como o esfregaço cérvico-vaginal foram submetidos à análise histopatológica mostrando a confirmação diagnóstica do achado clínico para 86 (67,19%) gestantes do total de 128.

5. Discussão

5.1. Positividade de HPV

Das 128 pacientes analisadas nesse estudo, 99 (77,34%) foram positivas para HPV. Tonon et al[41] em um estudo de índias na Argentina, fronteira com o Brasil, encontraram uma prevalência de infecção por HPV de 64%. Em outro estudo, Golijow et al[42], também realizado com mulheres argentinas, a prevalência de HPV em mulheres que não apresentavam lesões foi de aproximadamente 30%, já para as que apresentavam, a prevalência foi de 99 a 100%. Em outro estudo, realizado com mulheres indianas Singh et al[43] observaram que na população, 49,4% apresentavam lesões e tinham HPV. Em estudo recente realizado em Atlanta, Estados Unidos, com garotas de 13 a 19 anos, Samoff et al[21] descreveram que a prevalência de HPV foi de 78%. Em outro estudo realizado em Viena com gestantes assintomáticas, foi encontrado DNA de HPV em amostras cervicais em 36,6% das pacientes[44].

Apesar da alta positividade de HPV encontrada (77,4%) nas amostras analisadas, tal resultado é inferior a positividade relatada na literatura (90 a 100%), uma vez que todas as pacientes possuem algum tipo de lesão indicativa de doença HPV induzida. Tal resultado em parte deve-se ao caráter inconclusivo de alguns dados a respeito das lesões apresentadas pelas pacientes, pois apesar de algumas pacientes terem informação clínica sobre a presença de lesões, não houve uma confirmação desse quadro pelo exame histopatológico.

Os nossos dados são compatíveis com os encontrados na literatura em todo o mundo, demonstrando que, mesmo em países desenvolvidos, a taxa de mulheres contaminas com HPV é muito alta. Esse é um problema por si só preocupante, uma vez que é sabido que a infecção pelo vírus pode acarretar, problemas na gestação bem como no parto e pós parto. Mas o problema não acaba por ai, pois sendo uma DST, a alta taxa de contaminação de mulheres pelo HPV, mesmo na população em geral, é preocupante, uma vez que o risco de se contrair outras doenças, como o HIV é muito alto.

Quando avaliamos a região de coleta das amostras e comparamos com a positividade do HPV, vemos que para todas as regiões em questão, bem como para o total de amostras, há uma relação direta em apresentar lesões sugestivas de doença HPV induzida e apresentar positividade de DNA de HPV. Esses dados estão de acordo com o esperado, uma vez que é sabido que a infecção pelo HPV leva a alterações nas regiões

estudadas. Esses dados também estão de acordo com os encontrados na literatura, uma vez que os trabalhos referem associação de lesão com HPV[45,46,21], estando também de acordo com dados de HPV na gestação[47].

Os dados encontrados nesse estudo demonstram que a presença de lesões genitais está associada com o Papilomavírus Humano, assim como trabalhos encontrados em vários países[44,45,48], demonstrando que há necessidade de maior prevenção a fim de se promover uma diminuição do número de mulheres contaminadas pelo HPV.

Com relação aos tipos de HPV encontrados, tivemos 43,14% amostras tipadas como HPV 06, 11,77% amostras como sendo HPV 11, 7,84% amostras sendo HPV 16, 45,10% sendo HPV 18. Derchain et al[46], em trabalho publicado em 2004, associou a presença de DNA de HPV de alto risco com a presença de anormalidades morfológicas em biópsias cervicais. Nesse estudo todas as pacientes possuíam lesões genitais sugestivas de infecção por HPV, Fato que justificaria a genotipagem de alto grau e de baixo grau[22].

5.2. Positividade de *Chlamydia trachomatis* e associação com HPV

Foi analisada a positividade de 128 amostras para clamídia, sendo que já se sabia da positividade dessas em relação ao HPV. Dessas, obtivemos uma positividade de 23,44%; sendo que 22 amostras (17,19%) foram positivas, com correlação estatisticamente significativa, para ambos os micro organismos. Tais valores estão de acordo com os encontrados em estudos em vários países. Estudos recentes correlacionam a presença de HPV e a de *C. trachomatis*, mas nem sempre encontram correlação satisfatória. Golijow et al[42], em estudo recente, encontrou correlação parecida entre as amostras positivas para HPV e clamídia (12,5%) e para as negativas (10,9%), sendo que tais proporções estão de acordo com dados encontrados em outros países. Smith et al[17], também encontrou associação entre HPV e *C. trachomatis*, porém com diferença moderada. Vários outros estudos sugerem a associação dos dois agentes em questão[49,45,20,21] .

5.3. Associação de HPV e *Chlamydia trachomatis* com outros fatores

Neste trabalho avaliamos a relação de infectividade entre HPV e *C. trachomatis* em gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida. Avaliamos ainda

a positividade de HPV e *C. trachomatis* em relação a alguns fatores, sendo eles: métodos contraceptivos, estado civil, número de gestações, idade e outras infecções genitais.

Com relação aos métodos contraceptivos utilizados pelas pacientes, podemos observar que, quando as mesmas, faziam uso contraceptivo oral ou de nenhum método contraceptivo a incidência de HPV foi maior que a de clamídia. Diferentemente, pacientes que utilizaram preservativo durante a maior parte das relações sexuais não apresentaram diferença significativa entre as positividades de HPV e clamídia, indicando que a incidência em ambos os casos é a mesma. Tais resultados são compreensíveis, uma vez que fazendo uso de preservativos, tais mulheres estão, na maior parte da relação sexual protegidas contra uma eventual contaminação contra DST's. É conhecido também que a utilização de preservativos nem sempre é feita em todas as relações sexuais, fazendo com que mulheres que afirmam usar preservativo, tenham ainda assim uma chance de contrair DST's, explicando a tendência dos valores estatísticos à significância.

Esses dados nos indicam forte associação da não utilização de métodos anticoncepcionais com a presença de DNA HPV e *C. trachomatis*. Em artigo publicado recentemente no jornal *The Lancet*, Moreno et al[50], fizeram um estudo do efeito do uso de contraceptivos orais com o risco de se contrair HPV. Para o grupo controle, mulheres sem lesão que utilizavam contraceptivo oral, a positividade de HPV foi de 13,31%, já para as que apresentavam lesão cervical, a positividade foi de 90,45%; mostrando que o fato da não utilização de método anticoncepcional leva a uma predisposição para que se adquira HPV.

Outro dado importante, foi verificado quando analisamos os dados da relação do estado civil com a positividade de HPV e *C. trachomatis*. De acordo com o teste empregado, obtivemos significância estatística apenas nos dados relativos às pacientes solteiras e amasiadas, indicando que nesses casos a prevalência de HPV é maior que a de clamídia. Isso é esperado uma vez que, para mulheres não casadas, o número de parceiros sexuais pode ser maior, estando expostas assim a um número maior de agentes que podem levar ao desenvolvimento de alguma DST. Ao contrário, mulheres casadas tendem a manter um parceiro fixo além de contribuírem para que se realize um melhor controle e tratamento de lesões presentes no parceiro.

Outro fator, que está intimamente ligado ao estado civil, é a idade das pacientes. Em nosso estudo, segundo a análise estatística, obtivemos significância estatística para quase todas as idades avaliadas, com positividades mais expressivas entre os 15 e 20 anos para clamídia e entre os 21 e 25 anos para o HPV. Pelos dados presentes em nosso estudo podemos inferir que não há uma relação direta entre a presença de um ou outro agente e alguma faixa etária, uma vez que obtivemos diferenças significativas para todas as faixas etárias estudadas, excetuando-se as faixas em que tivemos um número amostral muito baixo, como é o caso do grupo abaixo dos 15 anos e do grupo acima dos 40 anos.

Schiffman et al[51] fizeram um estudo epidemiológico do HPV e descobriram que a maior incidência de HPV se dá nas idades onde ocorre a iniciação sexual. Em nosso estudo, não percebemos tal associação, porém foi nessa faixa etária em questão que houve maior incidência de *C. trachomatis*, informação importante dada a escassez de trabalhos nesta área no Brasil. No mesmo trabalho os autores dizem que nos Estados Unidos e na Europa vê-se uma grande queda da incidência de HPV a partir dos 50 anos. Em nosso estudo, apesar do número amostral ser pequeno para idades mais avançadas, podemos perceber que há uma queda de positividade de ambos os agentes, sugerindo que há um declínio, mas não podemos avaliar com precisão a partir de qual idade isso ocorre.

No Brasil, principalmente nas últimas décadas, tem havido modificações no quadro sócio-cultual, acarretando iniciações sexuais em idades mais jovens aliado à idades cada vez mais tardias com que as mulheres tem casado. Ambos os fatores contribuem para o aumento do número de parceiros sexuais aumentando assim a chance de se contrair alguma DST. Isso foi verificado para o HPV, que há um pico de incidência em faixas etárias intermediárias em nosso estudo, ou seja, de 21 a 30 anos. Já para *C. trachomatis*, houve uma maior incidência na faixa etária de 15 a 20 anos. Isso é preocupante uma vez que a maior parte das pacientes nesse estudo estão nessa faixa etária e apesar de não ser a maior, a prevalência de HPV é alta.

O número de gestações de cada paciente também foi avaliado. Só não foi observada diferença estatísticamente significativa para pacientes multigestas. Os resultados nos mostram que para pacientes primigestas, secundigestas e tercigestas a prevalência de HPV foi maior que a de *C. trachomatis*. Esses dados são representativos da população brasileira, principalmente se for observado a idade das pacientes onde se

teve maior positividade de HPV. O padrão da população brasileira atualmente é de se ter em média de dois filhos por casal, coincidindo assim a maior número de casos positivos de HPV e clamídia.

Com relação à outras infecções genitais, encontramos diferenças estatisticamente significativas apenas nas pacientes que tiveram candidíase e nas pacientes com Flora I, que é a flora vaginal normal. Trabalhos referem maiores taxas de infecção por vaginose bacteriana e tricomoníase[52].

Em nosso estudo encontramos associação entre a presença de HPV e *C. trachomatis*, mostrando que, durante a gravidez, a presença dos dois microorganismos é um fator preocupante pois cada um, separadamente acarreta um risco para a gestação. Quando as infecções por HPV e *C. trachomatis* forem considerados concomitantemente, tal risco aumenta, necessitando rastreamento dessa infecção no ciclo gravídico-puerperal.

Considerando a metodologia empregada e os resultado obtidos, podemos concluir que há relação de infectividade entre o Papilomavírus Humano e a *Chlamydia trachomatis* em gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida.

6. Referências Bibliográficas

1.Berman SM, Harrison HR, Boyce T, Haffner WJJ, Lewis M, Arthur JA. Low birth weight prematurity and postpartum endometritis. JAMA 1987;257:1189-94.

2.Govender L, Hoosen AA, Moodley J, Sturm A. Bacterial vaginosis and associated infectios in pregnancy. Int J Gynaecol Obstet 1996;55:23-8.

3.Williams Obstetrics; 20th edition; 2001; Cunningham, FG; MacDonald, PC; Gant, NF; Leveno, KJ; Gilstrap III, LC; Hankins, GDV; Clark, SL: Sesually Transmitted Diseases: 1317-1338.

4.Buchwald C, Lindeberg H, Pedersen BL, Franzmann MB. Human Papilloma Virus and p53 Expression in Carcinomas Associated With Sinonasal Papillomas: A Danish Epidemiological Study 1980–1998 Laryngoscope 2001; 111:1104–10.

5.Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, Eschenbach DA. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1998;178:374-80.

6. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith R, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1989;27:251-6.

7. Nagy E, Petterson L, Mardh PA. Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis. APMIS 1991;99:739-44.

8. Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. Obstet Gynecol 1992;79:369-73.

9.Nyirjesy P. Vaginits in the adolescent patient. Ped Clin N Am 1999;46:733-45.

10.Antonio MAD, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demografic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. J Infect Dis 1999;180:1950-6.

11.Host E, Rossel Goffeng A, Andersch B. Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. J Clin Microbiol 1994;32:176-86.

12.Gence MR. Treatament of genital *Chlamydia trachomatis* infection in pregnacy. Best Pract & Res Clin Obst and Gyn. 2002; 16(6): 913-22.

13.Cohen I, Veille JC, Calkins BM. Improved pregnancy outcome following succesful treatment of chlamydial infection. Jour of the Amer Med Ass. 1990; 236:3160-3.

14.Steven M. Anderson, Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clin Microb News 2002; 24(15): 113-8.

15.Vaganova IG.; Apoptosis and proliferation of epithelial cells in papillomaviral and chlamydial cervicitis; Vopr Onkol 2000;46(5):578-82.

16.Cotran, RS, Kumar V, Collins T. Neoplasias. In: Cotran, RS, Kumar V, Collins T editores. Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan; 2000. p. 261-262.

17.Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. Journ. of Inf. Dises.: 2002:185: 324-331.

18.Rughooputh S, Eddoo R, Manraj S, Jeebun N, Greenwell P. Detection of Human Papillomavirus from archival tissues in cervical cancer patients in Mauritius. Journ. of Clin. Virol. 2006: 35: 173-178.

19.Faro S. *Chlamydia trachomatis*: female pelvic infection. Am J Obstet Gynecol 1991;164:1767-70.

20.Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and chlamydia trachomatis. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43(4):277-281.

21.Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, et al. Association of Chlamydia trachomatis with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. Am. Jour. of Epidem.:2005: 162 (7): 668-675.

22.Knipe D M, Howley P M, Papillomaviroses In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology [serial online], 2001, 66:History. Avaiable from: http://pco.ovid.com/lrppco/index.html

23.Cavalcanti SMB, Carvalho MOO, Souza EA et al. Estudo de prevalência de papiloma vírus humanos em lesões do trato genital masculino. J Brás Doenças Sex Transm. 2001:13(2):27-31.

24.Oriel JD. Natural risk of genital warts. Brit J Vener Dis. 1971:47:1-13.

25.World Health Organization. Sexually transmitted infections increasing. 1990;152:1-5.

26.Kiviat NB, Wolner-Hanssen P, Peterson M. Localization of *Chlamydia trachomatis* infection by direct immunofluorecence and culture in pelvic inflammatory disease. Am J Obstet Gynecol 1986;154:865-9.

27.Masse R, Laperriere H, Lefebvre J, Remis RS. *Chlamydia trachomatis* cervical infection: prevalence and determinants among women presenting for routine gynecologic examination. Can Med Assoc J 1991;145:953-61.

28.Amaral MG. Avaliação da ocorrência da infecção por *Chlamydia trachomatis* e dos fatores de risco em gestantes [dissertação]. São Paulo: USP; 1989.

fatores de risco em gestantes [dissertação]. São Paulo: USP; 1989.

27.Tenório T, Leal JWB, Magalhães M, Cunha MP. Cervicite clamidiana: inter-relação clínico-ambulatorial. Ginecol Obstet Bras 1988;11:57-9.

28.De Luca LA, Silveira NRT, Camargo MA, Calderon IMP, Rudge MVC, Traiman P. Pesquisa sorológica de anticorpos anti-clamídias no soro e no muco cervical de parturientes e no cordção umbilical. Correlação com infecção neonatal. J Bras Ginecol 1991;101:63-5.

29.Cavaliere MJ, Maeda MYS, Shirata NK, Longatto Filho A, Shih LWS, Siqueira M, et al. Cervicovaginal *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant adolescent and adult women. Arch Gynecol Obstet 1993;253:175-82.

30.Simões JA, Giraldo PC, Ribeiro Filho AD, Faúndes A. Prevalência e fatores de risco associados à infecções cérvico-vaginais durante a gestação. Rev Bras Obstet 1996;18:459-67.

31.Gravett MG, Nelson HP, DeRouen T, Critchlow C, Eschenbach DA, Holmes KK. Independent associations of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* infection with adverse pregnancy outcome. JAMA 1986;256(14):1899-903.

32.Sweet R, Landers DV, Walker C, Schachter J. *Chlamydia trachomatis* infection and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 1987;156:824-33.

33.Trabulsi LR, Martinez MB. Chlamydia. In Trabulsi LR, Alterthum F, editors. Microbiologia: Atheneu; 2004. p. 441-443.

34.Francino O, Piñol J, Cabré O. Precipitation of DNA by cetyltrimethylammonium bromide to avoid coprecipitation of salts. Application of the method of recovery of *Drosophila* DNA following adsorption to hydroxyapatite. J of bioch and Biof Meth. 1987; 14(3): 177-180

35.De Roda Husman AM, Walboomers JM, Hopman E, Bleker OP, Helmerhorst TM, Rozendaal L, et al. HPV prevalence in cytomorphologically normal cervical scrapes of pregnant women as determined by PCR: the age-related pattern. J Med Virol 1995;46(2):97-102.

36.Grayson W, Taylor LF, Allard U, Tiltman AJ. Detection of human papillomavirus in large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a study of 12 cases. J Clin Pathol 2002;55:108–14.

37.Sead CMF. *Chlamydia trachomatis*. In Rosseti ML, da Silva CMD, Rodrígues JJS editores. Doenças Infecciosas: Guanabara Koogan; 2006. p. 61-73.

38.Spiegelberg R, Oehme R. Application of the polymerase chain reaction (PCR) method to the detection of human β-globin gene mutations. Mut Res Mutag and Rel Sub. 1989; 216(5): 288-289

39. Bauer HM , Ting Y , Greer CE , Chambers JC , Tashiro CJ , Chimera J ,et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. Intern Journ of Gynec & Obst. 1991; 36(4): 351.

40.Ripa K T, Madh, Per-Anders. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in Cycloheximide-Treated McCoy Cells: J of Clin Microb: 1977: 6(4): 328 – 331.

41.Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, Badano I, et al. Human Papillomavirus Cervical Infection in Guarani Indians From the Rainforest of Missiones, Argentina. Int Journ of Infec Dis: 2004; 8: 13-19

42.Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentina women. Gynec. Oncol.: 2005: 96: 181-186.

43.Sigh V, Sehgal A, Satyanarayana L, Gupta M, Parashari A, Chattopadhya A. Clinical presentation of gynecologic infections among indian women. Obst. & Gyn.:1995: 85 (2) : 215 – 219.

44.Worda C, Huber A, Hudelist G, Schatten C, Leipold H, Czerwenka K, et al. Prevalence of Cervical and Intrauterine Human Papillomavirus Infection in the Third Trimester in Asymptomatic Women. J SocGynecol Investig: 2005;12:440–444

45.Singh V, Sehgal A, Satyanarayana L, Gupta M, Parashari A, Chattopadhya D. Clinical Presentation of gynecologic Infections Among Indian Women. Obstet Gynecol: 1995; 85:215-219

46.Derchain SFM, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Zeferino LC, Zambeli LRO, Westin, MCA, et al. Human papillomavirus DNA detection and histological findings in women referred for atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ in their Pap smears. Gyn. Onc.: 2004: 95: 618-623.

47.Morrison EAB, Gammon MD, Goldberg GL, Vermund SH, Burk RD. Pregnancy and cervical infection with human papillomavirus. Int J Obstet Gynecol 1996;54:125-30.

48.Lehman M, Groh A, Rodel J, Nindi L, Straube E. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in cervical samples with regard to infection by Human papillomavirus. J of Infect. 1999:38: 12-17.

49.Edelman M, Fox A, Alderman E, Neal W, Shapiro A, Siver EJ, et al. Cervical Papanicolaou Smear Abnormalities and *Chlamydia trachomatis* in Sexually Active Adolescent Females. J Pediatr Adolesc Gynecol: 2000; 13:65-69

50.Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V, Walboomers JMM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric casecontrol study. The Lancet: 2002: 359: 1085-1092.

51.Schiffman M, Castle PE. Human Papillomavirus: Epidemiology and Public Health. Arch. Pathol. Lab. Méd.:2003: 127: 930-934.

52.Soares VL, Mesquita AMTS, Cavalcante FGT, Silva ZP, Hora V, Diedrich T,et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. Trop Med & Int Helth: 2003; 8 (7): 595-603

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO PATOLOGIA

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
☎(014) 6 802-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 6821-2348

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,

.....

após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa intitulado **"Pesquisa da relação de infectividade entre HPV e *Chlamydia trachomatis* em gestantes normais**", podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar.

Fui informada que no momento da minha consulta no Ambulatório de Infecções Genitais Femininas será colhida secreção cervical com "escovinha cervical" de acordo com as técnicas de rotina padronizadas no serviço, com o objetivo de se conhecer a prevalência de *Chlamydia trachomatis* e papilomavírus humano nas pacientes incluídas no estudo. Também fui informada que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Botucatu, ... de ..... de 2005.

Assinatura do Paciente: _____.

Assinatura do Pesquisador

João Manuel Grisi Candeias
Endereço do Pesquisador: Rua Dr. Luiz Ayres, 485 – CEP: 18607-020 – Botucatu - SP
Telefone (14) 3815-7254
E-mail: candeias@ibb.unesp.br

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de outubro de 2.005 *OF. 337/2005-CEP*

Ilustrissimo Senhor
Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias
Departamento de Micro/Imuno
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Prof. Candeias,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa ***"Pesquisa da relação de infectividade entre HPV e Chlamydia trachomatis em gestantes normais"****, a ser conduzido por Rodrigo Alessandro Riema Vela, com a participação de Jossimara Polettini, ambos orientados por Vossa Senhoria e da Profª Drª Márcia Guimarães da Silva, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/10/2005*

Situação do projeto perante o CEP: APROVADO

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP