

LISLÉIA GOLFETTO

**Detecção do HPV e da *Chlamydia trachomatis* em amostras de
cérvix uterina de mulheres da cidade de São Miguel do Oeste**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Farmácia na Área de concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Co-orientadora: Profa. Dra. Thaís Marques Sincero

**Florianópolis
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Golfetto, Lisléia Golfetto

Detecção do HPV e da Chlamydia trachomatis em amostras de cérvix uterina de mulheres da cidade de São Miguel do Oeste / Lisléia Golfetto Golfetto ; orientadora, Maria Luiza Bazzo Bazzo ; coorientador, Thais Marques Sincero Sincero. - Florianópolis, SC, 2014.
185 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Papilomavirus Humano (HPV). 3. Chlamydia trachomatis . 4. Diagnóstico molecular. I. Bazzo, Maria Luiza Bazzo. II. Sincero, Thais Marques Sincero. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

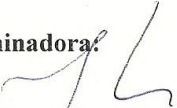
**“Detecção do HPV e Chlamydia trachomatis em
amostras de cérvix uterina de mulheres da cidade de
São Miguel do Oeste”**

POR

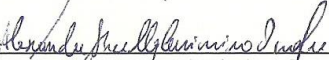
Lisléia Golfetto

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

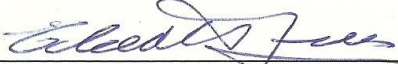
Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Eduardo Levi (USP/RP – Membro Titular)



Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre (UFSC – Membro
Titular)



Prof. Dr. Edison Natal Fedrizzi (UFSC – Membro Titular)



Profª. Dra. Maria Luiza Bazzo (UFSC – Orientadora)

Profª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais Lidenor e Sirlei pelo amor, apoio e incentivo.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e principalmente incentivo em mais uma conquista.

À professora orientadora Dr^a. Maria Luiza Bazzo pela oportunidade oferecida, pela orientação e pelo exemplo de ética e de profissionalismo.

À professora co-orientadora Dr^a. Thaís Marques Sinsero pelo apoio e conhecimento compartilhado, fundamentais em várias etapas.

Ao meu namorado Felipe de Rocco, pelo amor, carinho, paciência e, principalmente, apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e demais órgãos (CNpQ, CAPES, Projeto, PROGRAMA DST/AIDS e Hepatites Virais e FAPEU).

À Secretaria Municipal de Saúde de São Miguel do Oeste, em especial a secretária de saúde Josiane Castro por colaborar e permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Josiane Castro, ginecologista chefe da Secretaria Municipal de Saúde de São Miguel do Oeste, pela parceria construída.

Aos profissionais que compõem a equipe da Secretaria Municipal de Saúde de São Miguel do Oeste, em especial à técnica de enfermagem Elizene Gandim, por se disporem a coletar as amostras para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório Prevente, pela disponibilidade dos laudos de citologia, em especial ao citologista Christian Dannebrock, pelo apoio.

Ao Professor José Eduardo Levi, por gentilmente nos receber em seu laboratório para realização da última etapa do estudo.

Ao doutorando do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Tropical, Toni Ricardo Martins, pelo apoio não só nos experimentos, mas em todo o desenvolvimento deste estudo.

À professora Dr^a Jaqueline Germano de Oliveira, pela realização dos experimentos de sequenciamento.

Ao aluno de iniciação científica, Eduardo, pela dedicação.

A todos os colegas e integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias e do Laboratório de Hemopatias e Oncologia Experimental, pelo convívio, em especial aos colegas, Manoela, Renata, Daiane, Rodrigo, Letícia, Taiane, Lorena e Marcos.

À minha querida colega de laboratório e Dissertação, Pâmela Cristina Gaspar, pelo apoio nos momentos mais difíceis. Construímos uma grande amizade.

Aos professores Marcos Machado e Ana Carolina Rabello de Moraes, pela ajuda na estatística.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Papilomavirus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) são responsáveis pelas Doenças Sexualmente transmissíveis, de origem viral e bacteriana, mais prevalentes na população sexualmente ativa. O HPV desempenha papel central na etiologia de praticamente todos os casos de câncer cervical, entretanto, admite-se que outros fatores possam, conjuntamente com o vírus, modular o risco de transição da infecção cervical para a malignidade. Além do HPV, diversos estudos estão considerando a CT como um cofator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV. Diante disto, o objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de HPV, CT e a coinfeção HPV/CT por métodos moleculares (PCR-multiplex, *microarray*, RFLP e sequenciamento) em amostras cervicais de mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde da cidade de São Miguel do Oeste/SC. Trata-se de um estudo transversal, cujo desfecho é a positividade ao HPV e à CT. Durante o período de novembro de 2011 a março de 2013, foram coletadas amostras cervicais de 325 mulheres sexualmente ativas e que procuraram o serviço de saúde para rastreamento rotineiro do câncer cervical. As amostras foram submetidas à PCR-multiplex padronizada neste estudo, utilizando os conjuntos de iniciadores PGMY0911, CTP1/CTP2 e PCO3/PCO4. As amostras positivas para HPV foram submetidas à técnica de PCR-RFLP (Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição), *microarray* e sequenciamento. A prevalência do DNA de HPV foi de 24,6% na amostra estudada. Já em relação à CT a prevalência foi de 11,1% e 4,6% da amostragem total, apresentando coinfeção para HPV/CT. Observou-se associação do HPV com as seguintes variáveis: citologia ($p < 0,001$), idade ($p = 0,001$), idade de início da atividade sexual ($p = 0,008$) e o uso de anticoncepcional oral ($p = 0,048$). Encontrou-se associação entre a CT e o número de parceiros ao longo da vida ($p = 0,048$). Observou-se associação entre as variáveis: idade ($p = 0,006$) e uso de anticoncepcional oral ($p = 0,011$) com a presença da coinfeção HPV/CT. A genotipagem das amostras pelas três metodologias (RFLP, sequenciamento e *microarray*) identificou 32 genótipos diferentes de HPV, dentre eles o 16, 39, 53, 68 e 56 foram os mais prevalentes. A PCR-multiplex, padronizada neste estudo, mostrou-se útil no rastreamento simultâneo do HPV e da CT, assim como a metodologia PCR-RFLP apresentou um bom desempenho para a identificação concomitante de até dois tipos de

HPV em uma mesma amostra. O sequenciamento mostrou-se uma excelente ferramenta para a identificação de infecções por um único tipo viral, enquanto o Papillocheck[®] foi o método capaz de detectar amostras polinfectadas. A PCR-multiplex associada a PCR-RFLP pode ser utilizada como um método de rastreio e identificação de genótipos de HPV em infecções simples ou como discriminatório entre infecções simples ou múltiplas, enquanto que a análise por uma metodologia com maior poder discriminatório, pode ser utilizada como método complementar, principalmente em locais com poucos recursos financeiros. Embora a sensibilidade do RFLP tenha sido inferior ao desejável para a maioria dos tipos virais, o alto valor preditivo negativo desta metodologia define sua utilidade no rastreio do HPV, visto que resultados negativos em metodologias com elevado valor preditivo negativo são confiáveis.

Palavras chave: Papillomavírus Humano, *Chlamydia trachomatis*, coinfeção, PCR, PCR-RFLP, *microarray*.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) and *Chlamydia trachomatis* (CT) are responsible for the most prevalent sexually transmitted disease caused by virus and bacteria. HPV has a central role in the etiology of virtually all cervical cancers; however it is believed that other factors may also modulate the risk of a cervical infection progress to malignancy. Many studies consider CT as a cofactor in cervical intraepithelial neoplasia development as well other significant cell abnormalities in women with history of HPV infection. The aim of this study was to estimate the prevalence of HPV, CT and HPV/CT coinfection by molecular methods in cervical samples from women attending public health services at São Miguel do Oeste/SC. This is a cross-sectional study and the outcomes are positive results to HPV, CT or HPV/CT coinfection. A total of 325 cervical samples were collect from sexually active women seeking cervical cancer screening from November 2011 to March 2013. HPV, CT and coinfections were detected by PCR-multiplex using the consensus primers, PGMY0911, CTP1/CTP2 e PCO3/PCO4. HPV-positive samples were typed by PCR-RFLP, microarray and sequencing. The HPV, CT and HPV/CT prevalence were 24.6%, 11.1% and 4.6% respectively. Statistics associations were observed for HPV with the variables cytology ($p < 0,001$), age ($p = 0,001$), first sexual intercourse ($p = 0,008$) and oral contraceptive use ($p = 0,048$). There was a significant association between CT and number of partners along the life and age ($p = 0.006$), and oral contraceptive use ($p = 0.011$) with HPV/CT coinfection. A total of 32 HPV different genotypes were identified by RFLP, microarray and sequencing and the most prevalent types were 16, 39, 53, 68 and 56. The multiplex-PCR proved to be useful to simultaneously detect HPV and CT. The RFLP showed good performance to identify up to two viral types in the same sample. The sequencing methodology proved to be an excellent tool for the identification of a single viral type, while the Papillocheck[®] was the best method for samples infected for more than two viral types. The PCR-RFLP has a high predictive negative value and can be used as a screening method. To samples with more than two viral types a complementary methodology with high discriminatory power can be used. Alternatives protocols like combination of a cheap in house RFLP and an expensive commercial methodology with high discriminatory power can be used, specially in places with few financial resources to ensure best quality to screening.

Keywords: Human Papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, coinfection, PCR, RFLP, microarray

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do genoma do HPV.....	23
Figura 2	Evolução dos tipos de HPV associados à carcinogênese..	25
Figura 3	Representação esquemática do ciclo de vida do HPV e sua associação com a progressão ao câncer cervical.....	27
Figura 4	O Papel de E6 e E7 de HPV de alto risco no ciclo celular da célula hospedeira.....	30
Figura 5	Ciclo de desenvolvimento de <i>Chlamydia trachomatis</i>	49
Figura 6	Mecanismo da CT na carcinogênese cervical.....	62
Figura 7	Frequência da positividade do HPV, CT, Coinfecção HPV/CT e presença de HPVs oncogênicos na população estudada de acordo com a faixa etária.....	83
Figura 8	Curva de concentração de DNA plasmidial de CT.....	89
Figura 9	Alinhamento da sequência de 201pb do plasmídeo críptico de <i>CT trachomatis</i> clonado com a sequência do plasmídeo críptico da <i>Chlamydia trachomatis</i> (PLGV 440) depositada no GenBank sob número de acesso X06707.3.....	90
Figura 10	Alinhamento da sequência de 450pb gerada por sequenciamento automático do gene L1 do HPV clonado com a sequência do gene L1 do HPV 33 depositada no GenBank sob número de acesso DQ 486473.1.....	91
Figura 11	Padronização da temperatura de pareamento dos primers PGMY09/11, CTP1/CTP2 e β -globina, na PCR multiplex.....	92
Figura 12	PCR multiplex para a detecção do DNA de HPV, CT e β -globina humana em amostras clínicas.....	93
Figura 13	Aplicação da PCR com os iniciadores PGMY0911 em amostras cervicais positivas para HPV na reação PCR Multiplex.....	94
Figura 14	Genotipagem de amostra clínica por RFLP do HPV 16	95

	em gel de poliacrilamida 12%.....	
Figura 15	Eletroferograma do segmento de 450pb do gene L1 do HPV 53 de amostra clínica obtida pela PCR com os iniciadores PGMY0911.....	97
Figura 16	Alinhamento da sequência de 450pb do gene L1 do HPV de amostra clínica com a sequência do gene L1 do HPV 53 depositada no GenBank sob n° de acesso JN393898.1.....	97
Figura 17	Genotipagem de amostra clínica pela metodologia de <i>microarray</i> (Papillocheck®).....	99
Figura 18	Curva ROC da metodologia RFLP para os tipos de HPV 16, 18, 51e 58.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Doenças causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i> em humanos.....	48
Tabela 2	Relação dos iniciadores empregados para amplificação do DNA de HPV, <i>Chlamydia trachomatis</i> e no controle interno das reações de PCR.....	67
Tabela 3	Distribuição das variáveis estudadas de acordo com a presença de HPV, CT e Coinfecção HPV/CT.....	79
Tabela 4	Associação entre a positividade para <i>Chlamydia trachomatis</i> e HPV.....	81
Tabela 5	Razões de Chances (RC) e Intervalo de Confiança (IC) de 95% da Associação entre as variáveis estudadas e a presença de HPV, CT e Coinfecção.....	84
Tabela 6	Frequência global e estratificada por método dos tipos de HPV na amostra estudada.....	85
Tabela 7	Alterações citológicas encontradas em amostras, idade da paciente e tipo de HPV presente na amostra.....	88
Tabela 8	Tipos de coinfecção identificadas pelo método PCR-RFLP.....	96
Tabela 9	Amostras não concordantes entre as três metodologias de genotipagem do HPV.....	100
Tabela 10	Graus de concordância perfeita, muito boa e boa e entre a metodologia PCR-RFLP e as metodologias <i>microarray</i> (Papillocheck [®]) e sequenciamento para genotipagem do HPV.....	101
Tabela 11	Graus de concordância moderada, razoável, pobre e sem concordância para a metodologia PCR-RFLP e as metodologias <i>microarray</i> (Papillocheck [®]) e	

	sequenciamento para genotipagem do HPV.....	102
Tabela 12	Grau de concordância entra a metodologia PCR-RFLP e o Papillocheck® para genotipagem do HPV.....	103
Tabela 13	Grau de concordância entra a metodologia PCR-RFLP e o Sequenciamento para genotipagem do HPV.....	104
Tabela 14	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem do HPV pelo PCR-RFLP adotando-se como padrão ouro a metodologia de <i>microarray</i> (Papillocheck®) e o sequenciamento.....	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	Gene humano adenosina desaminase
Afa-1	Fator ativador da apoptose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Atipias em células escamosas
ASC-H	Atipias em células escamosas de significado indeterminado em que não é possível descartar Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
ASC-US	Atipias em Células Escamosas de Significado Indeterminado
ASHA	<i>American social health association</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
β-globina humana	Gene da beta-globina humana
BSA	Soro Albumina Bovina
Cdk	Quinases ciclina-dependentes
CE	Comunidade europeia
CH2	Captura Híbrida dois
CHSP60	<i>Chlamydial heat shock protein 60</i> – (Proteína do choque térmico clamidiana 60)
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>cutt-off/ threshold</i>	Limite de detecção
DAS	Amplificação por deslocamento de cadeia
CDC	<i>Centers for Diseases Control e Prevention</i>
DIP	Doença inflamatória pélvica
DIU	Dispositivo intrauterino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DSTs	Doenças sexualmente transmissíveis
E1 a E7	Proteínas não estruturais da região precoce (E)
EB	Corpos elementares
EC	<i>Cellular enhancer</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunossorbent assay</i>
Fase S	Fase do ciclo celular em que ocorre a síntese de DNA
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

HC CT-ID	Teste de Captura Híbrida específico para <i>Chlamydia trachomatis</i>
HC GN-ID	Teste de Captura Híbrida específico para <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
HC II CT/NG	Teste de Captura Híbrida II para <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA -DPB1	Gene do Antígeno Leucocitário Humano- DPB1
HPV	Papilomavirus humano
HSIL	Lesões intraepiteliais de alto grau
HSP10	<i>Heat shock protein 10</i>
HSP60	<i>Heat shock protein 60</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de Confiança
ICTV	<i>Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
IF	Imunofluorescência direta
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INOLIPA	<i>Line probe assay</i>
IPT-G	<i>isopropylthio-β-galactoside</i>
JEC	Junção escamo colunar
Kb	Quilo pares de bases
L1 e L2	Proteínas do capsídeo da região tardia (L)
LB	Luria Base
LBMM	Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina
LCR	<i>Long control region</i>
LCR	Reação em Cadeia da Ligase
LPS	Antígeno lipopolissacarídeo
LSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
Mb	Mega pares de bases
MHCI	Complexo Principal de Histocompatibilidade
Microarray	Microarranjos de DNA ou Chips de DNA
MOMP	<i>Major outer membrane proteins</i> - – (Maior Proteína de Membrana)
MS	Ministério da Saúde
NAATs	Testes de amplificação dos ácidos nucleicos
NASBA	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
NF-KB	Fator nuclear

NIC I	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau I
NIC II	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau II
NIC III	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau III
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i> – (Regiões de Leitura Aberta)
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pg	Pico grama
Pool	Conjunto
pRb	Proteína do retinoblastoma
Primers	Oligonucleotídeos iniciadores, ou iniciadores ou pequenos segmentos de nucleotídeos
p16^{INK4a}	Proteína 16 inibidora de quinase da família INK4a.
p53	Proteína 53
RB	Corpúsculos reticulares
RC	Razão de Chance
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
RFLP	<i>Restriction fragmente length polymorphism</i>
RLU	Unidade de Luz Relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_r	RNA ribossômico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris-EDTA
TLRs	Receptores denominados de <i>Toll Like Receptors</i>
TMA	<i>Transcription mediated amplification</i>
TMA	Amplificação baseada na sequência de amplificação mediada por transcrição
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VAINII/III	Neoplasias Intraepiteliais vaginais
VINII/III	Neoplasias Intraepiteliais vulvares
VLPs	<i>Virus like particles</i>
X-gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside</i>
16S	Subunidade 16 do Ribossomo
23S	Subunidade 23 do Ribossomo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO – HPV	33
3.1.1 <i>Estrutura do Genoma Viral</i>	33
3.1.2 <i>Classificação do HPV</i>	35
3.1.3 <i>Ciclo de infecção do HPV</i>	38
3.1.4 <i>Mecanismo da carcinogênese cervical</i>	40
3.1.5 <i>História natural da infecção pelo HPV</i>	42
3.1.6 <i>História natural da infecção pelo HPV e carcinogênese cervical</i>	43
3.1.7 <i>Prevalência da infecção pelo HPV e câncer cervical</i>	45
3.1.8 <i>Vacinas</i>	47
3.1.9 <i>Métodos de diagnóstico para o HPV</i>	50
3.1.9.1 Diagnóstico Morfológico	50
3.1.9.1.1 Exame citopatológico.....	50
3.1.9.1.2 Histopatologia	52
3.1.9.2 Diagnóstico molecular.....	52
3.1.9.2.1 Captura Híbrida.....	53
3.1.9.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	54
3.1.9.2.3 PCR em tempo real (<i>Real time PCR</i>)	55
3.1.9.2.4 PCR-RFLP (PCR – <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	55
3.1.9.2.5 Hibridização reversa.....	56
3.1.9.2.6 <i>Microarray</i> (Microarranjos de DNA ou Chips de DNA)	57
3.1.9.2.7 Detecção do RNA mensageiro (RNAm) para as oncoproteínas E6 e E7.....	58
3.1.9.2.8 Sequenciamento	59
3.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	59

3.2.1 Prevalência da Infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i>	64
3.2.2 Diagnóstico Laboratorial da infecção por CT.....	66
3.2.2.1 Cultura Celular.....	66
3.2.2.2 Métodos para Detecção de Antígeno.....	67
3.2.2.2.1 Imunofluorescencia Direta (IF).....	67
3.2.2.2.2 Métodos Imunoenzimáticos (ELISA – <i>Enzyme linked immunossorbent assay</i>).....	68
3.2.2.3 Métodos Moleculares.....	68
3.2.2.4.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	69
3.2.2.4.2 Captura Híbrida.....	70
3.3 MECANISMOS DE INFECTIVIDADE DE <i>Chlamydia trachomatis</i> ASSOCIADA AO HPV E AO CÂNCER.....	71
4 JUSTIFICATIVA	75
5 METODOLOGIA	77
5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	77
5.2 COMITÊ DE ÉTICA.....	77
5.3 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	77
5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	78
5.5 EXTRAÇÃO DO DNA.....	78
5.6 PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DO DNA DO HPV E CT	79
5.7 PCR COM OS INICIADORES PGMY0911 PARA A GENOTIPAGEM DO HPV	80
5.8 POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)	81
5.9 PCR COM OS INICIADORES CTP1/CTP2 PARA A DETECÇÃO DO DNA CT	81
5.10 CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS PARA HPV E CT.....	82
5.10.1 Preparação de Células Competentes.....	82
5.10.2 Ligação do produto de PCR ao P-GEM T-Easy – Formação do DNA Recombinante.....	83
5.10.3 Transformação das Células Competentes.....	83

5.10.4 Seleção das colônias	84
5.10.5 Extração do DNA plasmidial	84
5.10.6 PCR com os iniciadores CTP1/CTP2 para a amplificação do DNA plasmidial de CT	85
5.10.7 PCR com os iniciadores PGMY09/11 para a amplificação do DNA plasmidial de HPV	85
5.11 SEQUENCIAMENTO	85
5.11.1 Purificação do DNA	86
5.11.2 PCR, precipitação do DNA e sequenciamento.....	86
5.11.3 Análise das Sequências	87
5.12 MICROARRAY – KIT PAPILOCHECK® (GREINER BIO-ONE)	87
5.12.1 Reação de PCR.....	87
5.12.2 Reação de Hibridização e leitura dos resultados.....	87
5.12.3 Controle de Qualidade	88
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	89
6 RESULTADOS.....	90
6.1 PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DE CT E OBTENÇÃO DO CONTROLE POSITIVO PARA A CT.....	100
6.2 CLONAGENS PARA OBTENÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS PARA CT E HPV	101
6.2.1 Clonagem do controle positivo para CT.....	101
6.2.2 Clonagem do controle positivo para HPV	102
6.3 PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DO DNA DO HPV E CT	104
6.4 PCR COM OS INICIADORES PGMY0911 PARA A GENOTIPAGEM DO HPV.....	105
6.5 POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	106
6.6 SEQUENCIAMENTO	108
6.7 MICROARRAY – KIT PAPILOCHECK® (GREINER BIO-ONE)	110
6.8 ANÁLISE DA GENOTIPAGEM DO HPV PELOS MÉTODOS PCR-RFLP, SEQUENCIAMENTO E PAPILOCHECK®	111

<i>6.8.1- Concordância entre o método PCR-RFLP e os métodos de sequenciamento e microarray (Papillocheck®) para a genotipagem do HPV.....</i>	<i>113</i>
<i>6.8.2- Concordância entre as metodologias PCR-RFLP e microarray (Papillocheck®) para genotipagem do HPV.....</i>	<i>114</i>
<i>6.8.3- Concordância entre as metodologias PCR-RFLP e sequenciamento para a genotipagem do HPV.....</i>	<i>115</i>
<i>6.8.4 – Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do PCR-RFLP</i>	<i>116</i>
7 DISCUSSÃO.....	122
8 CONCLUSÕES.....	141
9 PERSPECTIVAS.....	143
REFERÊNCIAS.....	145
ANEXO A- TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	180
ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.....	185

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavirus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) são responsáveis pelas doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), de origem viral e bacteriana mais prevalentes na população sexualmente ativa. Ambos infectam pele, mucosas, trato genital masculino e feminino, desenvolvendo lesões benignas que podem evoluir para a malignidade no caso do HPV e para salpingite, doença inflamatória pélvica e infertilidade no caso da CT (KALAKUN; BOZZETTI, 2005, TAO; HOOVER; KENT, 2012).

A infecção persistente pelo HPV é considerada a principal causa do câncer de colo do útero e atualmente está sendo fortemente relacionada ao câncer vaginal, vulvar, peniano e anal. É responsável por 90% dos cânceres do canal anal, 40% dos cânceres vulvar e peniano e 12% dos cânceres de orofaringe (ALBA et al. 2009).

O HPV desempenha papel central na etiologia de praticamente todos os casos de câncer cervical, entretanto, embora sendo uma causa necessária, muitas vezes não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical. Admite-se que outros fatores conjuntamente com o vírus modulem o risco de transição da infecção cervical para a malignidade (SCHIFFMAN et al., 2011).

Além do HPV, diversos estudos estão considerando a CT como um cofator no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV (TAMIM et al., 2002; SMITH et al., 2002; KULASINGAM, et al., 2002; CUSCHIERI, et al., 2004).

Na maioria das mulheres (70% a 75%) e em mais de 50% dos homens, as infecções por HPV e CT cursam de forma assintomática. Assim, esses micro-organismos podem ser considerados bem adaptados ao ser humano, uma vez que conseguem multiplicar-se sem causar respostas exacerbadas do organismo e, conseqüentemente, apresentam dificuldades para o seu diagnóstico (BRASIL, 1999, 2006; WHO, 2012).

A infecção persistente por CT parece ter papel facilitador na carcinogênese cervical por meio das *heat shock proteins* 60 (HSP60). Essas proteínas sintetizadas por CT têm ação antiapoptótica durante a infecção persistente, facilitando a atuação das oncoproteínas em células simultaneamente infectadas por HPV de alto risco (HPV tipo 16 e 18) (DI FELICE et al., 2005). Entretanto, a magnitude da associação entre

CT e lesões intraepiteliais cervicais ainda não foi esclarecida (OLIVEIRA et al., 2008).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as DSTs são a segunda enfermidade que mais acomete as mulheres entre 15 e 44 anos nos países em desenvolvimento (WHO, 2005). Em relação à CT mais de 100 milhões de homens e mulheres estão infectados (WHO, 2012), e esta infecção é comumente relatada como uma das DSTs mais prevalentes nos países desenvolvidos, com mais de 1,2 milhões de casos registrados nos Estados Unidos em 2009 (CDC, 2011). O diagnóstico dessa infecção aumentou significativamente ao longo da última década (VICKERS; OSGOOD, 2010), principalmente pela inclusão de métodos moleculares no rastreamento, entretanto, existem evidências de que a prevalência também esteja aumentando na população de alguns países tais como Austrália (O'ROUKE et al., 2009; VODSTRCIL et al., 2011) e Suécia (GOETZ et al., 2002).

A infecção por CT se não tratada pode causar significativa morbidade, particularmente em mulheres, se a infecção ascender da ectocérvice para o trato genital superior causando a doença inflamatória pélvica (DIP). Esta por sua vez pode causar cicatrizes nas tubas uterinas elevando a possibilidade de ocorrer gravidez ectópica, infertilidade tubária e dor pélvica crônica (PEIPERT, 2003; HAGGERTY et al., 2010). A CT pode aumentar o risco de transmissão do HIV e pode causar inflamação dos testículos no homem. Além disso, a infecção genital em mulheres grávidas pode causar prematuridade e baixo peso em recém-nascidos e também pode ser transmitida para o bebê durante o parto, causando infecções oculares e pulmonares no recém-nascido (HOCKING et al., 2013).

O câncer de colo do útero representa o segundo câncer mais comum entre as mulheres no mundo, superado apenas pelo câncer de mama. É uma doença que pode ser prevenida, se as lesões pré-cancerosas forem detectadas em estágios precoces. As estimativas mundiais sobre incidência e mortalidade por câncer prevêm 530.000 novos casos/ano e mais de 270.000 óbitos, sendo sua maior incidência em países em desenvolvimento (WHO, 2013b). A prevalência mundial de infecções genitais por HPV é cerca de 440 milhões. As maiores taxas de incidência estimada de câncer do colo do útero ocorrem na África, América Central e do Sul e Ásia (WHO, 2013b).

No Brasil, o câncer de colo do útero é o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama e do

colorretal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Por ano, faz 4.800 vítimas fatais e apresenta incidência 18.430 casos (BRASIL, 2013b). No país, existe uma grande variação nas taxas de incidência, sendo as maiores nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Dos cinco Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) em funcionamento no país, o câncer de colo do útero foi o tumor mais incidente em Belém e Goiânia, ficando em segundo lugar em Fortaleza, Campinas e Porto Alegre. No sistema atual, mais de 70% das pacientes diagnosticadas com câncer de colo do útero apresentam a doença em estágio avançado já na primeira consulta o que limita, em muito, a possibilidade de cura. De todas as mortes por câncer em mulheres brasileiras da faixa etária entre 35 e 49 anos, 15% morrem devido ao câncer de colo do útero (BRASIL, 2013b). No Brasil a infecção por CT não está incluída entre as DSTs de notificação compulsória e não existe um programa de rastreio para esta infecção. Estima-se que ocorram cerca de 1.967.200 novos casos de clamídia a cada ano (WHO, 2001). No entanto, os dados existentes na literatura sobre a infecção pela clamídia no Brasil são referentes a amostras pequenas, geralmente específicas de um serviço de saúde ou de um município, carecendo de estudos envolvendo as diferentes regiões do país (JALIL et al., 2008; PIAZZETA et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a prevalência de HPV e *Chlamidia trachomatis* por métodos moleculares e a coinfeção HPV/Clamídia em amostras cervicais de mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde (SUS) da cidade de São Miguel do Oeste – SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a PCR multiplex utilizando os conjuntos de iniciadores consenso, PGMY09/11 para a detecção do HPV, CTP1/CTP2 para a detecção da CT e como controle interno os iniciadores PCO3/PCO4 para detecção do gene da beta-globina humana;
- Padronizar a técnica de PCR utilizando os iniciadores consenso PGMY09/11 para a obtenção de controles positivos por meio da clonagem para o diagnóstico do HPV;
- Padronizar a técnica de PCR-RFLP para a identificação dos tipos de HPV na população estudada;
- Sequenciar os perfis de HPV obtidos pelo PCR-RFLP;
- Utilizar a metodologia comercial de *microarray* (PapilloCheck[®]) para comparar com os resultados obtidos pela metodologia de PCR-RFLP;
- Comparar os resultados da citologia com os resultados da PCR, PCR-RFLP e *microarray* (PapilloCheck[®]);
- Padronizar a técnica de PCR utilizando os iniciadores consenso CTP1/CTP2 para a obtenção de controles positivos por meio da clonagem para o diagnóstico da clamídia;
- Correlacionar os resultados obtidos pela PCR-RFLP para detecção do HPV com os obtidos para o diagnóstico de clamídia.
- Avaliar os fatores de risco associados à infecção pelo HPV e pela CT.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO – HPV

Os papilomavírus são pequenos vírus não envelopados, envolvidos por um capsídeo de formato icosaédrico de aproximadamente 50nm de diâmetros. Pertencem à família *Papillomaviridae* capazes de infectar inúmeros vertebrados, incluindo o homem (BERNARD, et al., 2010).

3.1.1 Estrutura do Genoma Viral

O genoma do HPV é formado por uma molécula de DNA de dupla fita circular com aproximadamente 8 mil pares de bases (pb) que codifica aproximadamente 300 mil daltons de proteínas. Seu genoma pode ser dividido em três regiões principais: uma região de controle (LCR-*long control region*), uma região “E” precoce (E-*early*) e uma região “L” tardia (L-*late*) (Figura 1). A região LCR corresponde a 15% do genoma e contém os genes promotores envolvidos na transcrição e replicação viral. Essa região é dividida em dois domínios principais: o RE2, que contém a origem de replicação e é regulada pela presença da proteína viral E2 e o domínio EC (*cellular enhancer*), um potente promotor da transcrição viral que é exclusivamente regulado pelos fatores de transcrição da célula. Os promotores iniciais da replicação viral são encontrados no domínio R2F no momento em que os oncogêneses E6 e E7 são transcritos (COLE, DANOS, 1987; ALBA et al., 2009).

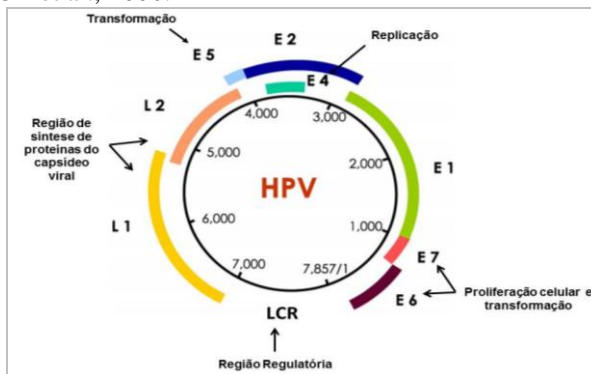
A região precoce “E” (*Early*) representa 45% do genoma viral e possui sete janelas de leitura aberta, as quais codificam as proteínas não estruturais E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7 que estão envolvidas no controle da replicação do DNA viral e indução da malignidade nas células hospedeiras. O gene E1 está envolvido na replicação do DNA viral na forma episomal; o gene E2, desempenha o papel mais importante no ciclo viral, uma vez que tem a capacidade de suprimir ou ativar os promotores virais envolvidos na síntese de E6 e E7. Em baixas concentrações, E2 é ativador da transcrição viral, enquanto que, em concentrações elevadas, reprime a transcrição. A perda da expressão de E2 está relacionada ao aumento da proliferação celular induzida por E6

e E7 e ao desenvolvimento do carcinoma cervical. Até o momento, não se conhece o papel do gene E3 no ciclo viral. O gene E4 está envolvido na maturação das partículas virais e na alteração da matriz intracelular (formação do coilócito) (HUMBERT; SEDMAN; SCHILLER, 1992; ALBA et al., 2009). O gene E5 é expresso como parte do processo de replicação inicial, também é inibidor da apoptose e mantém as células epiteliais cervicais em constante replicação. Pouco se sabe sobre a função e atividade específicas de E5, entretanto, este gene está envolvido em eventos iniciais da infecção e tem um papel desconhecido nas fases tardias de replicação viral. A expressão de E5 também está associada com a regulação negativa do Complexo Principal de (MHCI) sugerindo o papel de E5 na evasão viral da imunidade celular (IBEANU, 2011). A perda ou mutação dessa região evita a replicação do DNA na forma epissomal e favorece a integração do DNA na célula hospedeira (HUBBER; SEDMAN; SCHILLER, 2002; ALBA et al., 2009).

Os genes E6 e E7 estão envolvidos no estímulo da proliferação e transformação celular, ou seja, eles agem como oncoproteínas virais, capazes de imortalizar os queratinócitos. Essas funções de E6 e E7 estão relacionadas estritamente aos tipos de HPV oncogênicos (HUBBER, SEDMAN, SCHILLER, 2002; ALBA et al., 2009).

A região tardia “L” (*late*) corresponde a 40% do genoma e contém dois genes que codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral: L1, altamente conservada entre os diferentes tipos de HPV, e L2 específica para cada tipo viral (HUBBER, SEDMAN, SCHILLER, 2002; ALBA et al., 2009).

Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV. Adaptado de MUÑOZ et al., 2006.



3.1.2 Classificação do HPV

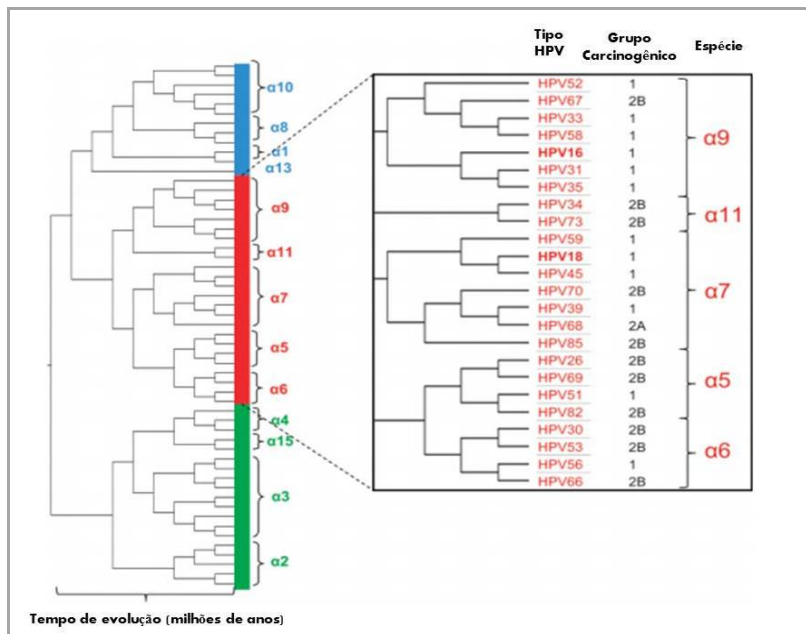
Os papilomavirus compreendem um grupo de vírus distintos que podem infectar uma infinidade de vertebrados, incluindo o homem, aves e répteis, sendo os Papilomavírus Humanos (HPVs) os mais estudados. De acordo com o *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV), o HPV pertence à família *Papillomaviridae*, gêneros papilomavírus *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Delta*, *Kappa*, *Lambda*, *Um*, *Nu* e *Zeta*, classificados de acordo com diferenças nas suas sequências nucleotídicas. O gênero Alfa é clinicamente mais importante, pois compreende os vírus que infectam a mucosa genital e orofaríngea e incluem os tipos oncogênicos associados ao câncer cervical (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, et al., 2010).

A classificação do HPV em tipos é baseada na sequência nucleotídica das regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame*) do gene L1. Um novo tipo é identificado quando a variação da sequência nucleotídica é maior que 10%, variações entre 3-10% são consideradas subtipos, enquanto as variantes diferem menos que 3% e tipicamente apresentam variação em um único nucleotídeo. Os papilomavirus são denominados pela abreviação HPV seguida por um número à medida que um novo tipo é descoberto (DE VILLIERS et al., 2004; SCHIFFMAN et al., 2010).

Mais de 200 tipos de HPV já foram descritos até o momento, sendo que cerca de 45 infectam o trato anogenital. Os tipos 6, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 64, 70, 71, 72, 74, 78, 81, 83, 84, 86, 87, 89 e CP6108 são classificados como baixo risco oncogênico por estarem associados a lesões benignas e condilomas acuminados; os tipos 26, 53 e 66 são classificados como potencialmente oncogênicos; enquanto os tipos 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 91 são classificados como alto risco oncogênico por estarem associados a lesões pré-cancerosas e ao câncer do colo do útero (MUNOZ et al., 2003; DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, et al., 2010).

Recentemente, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou 12 tipos de HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 como carcinógenos grupo 1 (oncogênicos ou alto risco) (BOUVARD; BAAN; STRAIF, et al., 2009) por estarem associados a lesões pré-cancerosas e ao câncer cervical (MUÑOZ et al., 2003; MUÑOZ et al., 2006). Como podem ser observados na Figura 2, esses 12 tipos de HPV originam-se de quatro espécies de um único ramo do gênero alfa da árvore evolutiva do Papilomavírus Humano. O mesmo ramo evolutivo inclui o HPV 68, classificado pela IARC como carcinógenos do grupo 2A (provavelmente carcinogênicos para a espécie humana) e os tipos 67, 34, 73, 70, 85, 26, 69, 82, 30, 53 e 66 como carcinógenos do grupo 2B (raramente carcinogênicos) (LI et al., 2011).

Figura 2: Evolução dos tipos de Papiloma vírus Humano (HPV) associados à carcinogênese.



As espécies do gênero alfa (esquerda) infectam as mucosas anogenitais e a cavidade oral. A árvore filogenética é baseada no alinhamento de regiões de leitura aberta do gene “E” (early) e “L” (late). Os tipos de HPV em azul (correspondem às espécies α1, α8 α10 e α13), são responsáveis pela formação das verrugas genitais. Os tipos de HPV em verde (correspondem às espécies α2, α3 α4 e α15), são responsáveis por infecções comensais. Os tipos de HPV em vermelho (correspondem às espécies α5, α6 α7, α9 e α11) (mostrados em detalhes à direita) estão associados aos diferentes graus do câncer cervical e das neoplasias intraepiteliais cervicais de grau 3 (NIC 3). Os oito tipos que são mais comumente associados ao câncer cervical pertencem às espécies α9, ou, em menor extensão, à α7. A classificação dos tipos de HPV está de acordo com a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* (BOUVARD V, BAAN R, STRAIF K, et al., 2009): grupo 1: carcinogênicos, grupo 2A: provavelmente carcinogênicos e grupo 2B: possivelmente carcinogênicos. Adaptado de SCHIFFIMAN et al., 2011.

Os quatro principais tipos relacionados a lesões genitais são os HPV's 6, 11, 16 e 18. O HPV 6 foi descoberto em 1982 em um tumor genital (o raro tumor Buschke-Lowenstein), embora seja tipicamente encontrado em verrugas genitais benignas (condilomas acuminados). Em 1983, os HPV 11 e 16 foram relacionados a lesões cervicais. Posteriormente o HPV 16 foi isolado de papillomas de laringe e verrugas genitais (ZUR HAUSEN, 2009). Desde então, inúmeros estudos moleculares têm demonstrado que o HPV 6 e 11 estão presentes em cerca de 90% das verrugas genitais benignas. Em contraste, os HPV's 16 e 18 são relacionados à persistência e progressão de lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), lesões pré-cancerosas e na maioria dos cânceres cervicais invasivos. Eles são responsáveis por cerca de 50-70% e 20-30% respectivamente dos cânceres cervicais diagnosticados no mundo. Os tipos 31, 33, 45, 52 e 58 são também oncogênicos, mas bem menos prevalentes no carcinoma cervical (ZUR HAUSEN, 2002, 2009; CHAUHAN et al., 2009; EINSTEIN et al., 2009).

Outras lesões malignas do trato anogenital também estão frequentemente relacionadas às infecções por tipos de HPV de alto risco, incluindo o câncer de vulva, pênis e ânus (EINSTEIN et al., 2009).

3.1.3 Ciclo de infecção do HPV

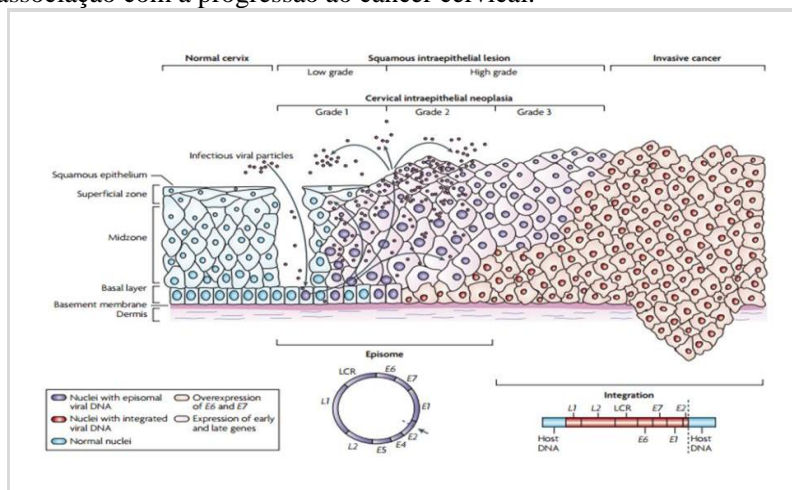
A infecção pelo HPV inicia quando partículas virais entram em contato com células da camada basal do epitélio escamoso estratificado (Figura 3) por meio de micro abrasões ocasionado, muitas vezes, durante o intercurso sexual. A entrada do HPV nas células não está bem compreendida, mas acredita-se que ela seja mediada pelo receptor sulfato de heparina (LETIAN; TIANYU, 2010; GIRGLOU et al., 2001). Uma vez no interior da célula hospedeira, o núcleo do HPV é desnudo, seu genoma se estabelece na forma episomal e replica-se simultaneamente com o DNA da célula. A replicação do HPV é dependente da maquinaria das células cervicais, que são subvertidas pelas proteínas E1 e E2 do HPV (IBEANU, 2011).

A infecção inicial de células basais pelo HPV promove a ativação dos genes precoces E1 e E2, responsáveis pela ativação e manutenção da replicação viral, o que resulta na produção de aproximadamente 100 cópias de DNA viral episomal por célula infectada. Essa quantidade de cópias é mantida em células indiferenciadas da camada basal durante a

infecção. As células infectadas com HPV continuam seu processo de divisão e a cada ciclo de vida completado, uma das células filhas permanece na camada basal e continua o processo de replicação enquanto a outra migra para as camadas superficiais epiteliais e inicia o processo de diferenciação celular. As proteínas precoces E5, E6, E7 são expressas e estimulam o crescimento e propagação celular a fim de assegurar um estado constante de crescimento e propagação. (LETIAN; TIANYU, 2010; HAMID et al., 2009).

Na camada suprabasal, o genoma viral é intensamente replicado e as proteínas virais tardias L1 e L2 são expressas assim como a proteína E4 (STUBENRAUCH; LAIMINIS, 1999; HAMID et al., 2009; LETIAN; TIANYU, 2010). As proteínas L1 e L2 são responsáveis pela formação do capsídeo viral e postula-se que a proteína viral E4 facilita a liberação do HPV dos queratinócitos (IBEANU, 2011). A partir deste momento, os vírions, partículas virais maduras, estão formados e prontos para infectar outras células (STUBENRAUCH; LAIMINIS, 1999; HAMID et al., 2009; LETIAN; TIANYU, 2010).

Figura 3: Representação esquemática do ciclo de vida do HPV e sua associação com a progressão ao câncer cervical.



O HPV infecta células epiteliais escamosas da camada basal através de micro fissuras no epitélio. Após a infecção, inicia-se a expressão das proteínas precoces E1, E2, E5, E6 e E7 e o DNA do HPV é replicado na forma episossômica (representado por núcleos roxos). Nas

camadas superficiais do epitélio, o genoma viral é altamente replicado e ocorre a expressão dos genes tardios L1, L2 e E4 responsáveis pela formação e liberação da partícula viral madura (vírion) através da descamação epitelial e, posteriormente, uma nova infecção acontece. A progressão de lesões não tratadas ao câncer cervical está associada à integração do genoma do HPV ao genoma da célula hospedeira (representada por núcleos vermelhos) que culmina na destruição do gene E2 e subsequente superexpressão dos oncogêneses E6 e E7, promovendo a transformação celular e o desenvolvimento do câncer cervical. Adaptado de WOODMAN et al., 2007.

A grande maioria das infecções pelo HPV é benigna e autolimitada. A progressão ao câncer cervical não faz parte do ciclo de vida normal do HPV e está associada a longos períodos de infecção com tipos de HPV oncogênicos (IBEANU, 2011).

3.1.4 Mecanismo da carcinogênese cervical

Na maioria das lesões pré-cancerosas, o genoma do HPV está na forma episossomal, enquanto na maioria das infecções classificadas como lesões de alto grau (HSIL), o genoma do HPV encontra-se integrado no genoma da célula hospedeira. Em mais da metade dos cânceres cervicais causados por HPV 16 e na maioria dos causados por HPV 18, o genoma viral está integrado ao genoma da célula hospedeira, sugerindo que a integração em alguns casos contribui para o desenvolvimento de lesões cancerosas. Em lesões contendo DNA do HPV na forma episossomal, a proteína viral E2 reprime a expressão de genes precoces como parte do mecanismo de regulação da replicação viral (D'SOUZA et al., 2007). A integração do DNA viral usualmente interrompe a expressão de E2, levando a desregulação da expressão dos genes virais precoces, principalmente E6 e E7 (DAVIES et al., 1993; DE VILLIERS et al., 2004), bem como aumento da proliferação celular, um passo crucial para a progressão ao câncer (CHATURVEDI et al., 2008). A expressão das proteínas E6 e E7 promove um aumento da replicação de DNA de HPV integrado e diminui o número de cópias de DNA na forma episossomal. A reintrodução de E2 em células cancerígenas HPV positivas que contêm somente DNA viral na forma integrada resulta na senescência celular (FAUSCH, DA SILVA, KAST, 2003), indicando que E6 e E7 são necessários para manter o fenótipo transformado (FERTEY et al., 2011; FORSLUND et al., 2007). Estudos

sugerem que um importante passo envolvido na carcinogênese cervical pode ser a coexistência de cópias de HPV na forma episossomal e integrada (FREGA et al., 2012). A expressão das proteínas virais E1 e E2 na forma episossomal pode estimular a replicação viral na forma integrada, induzindo a anormalidades cromossômicas, ativação do reparo do DNA, aumento da mutação celular adquirida, resultando em instabilidade genômica e eventual progressão à malignidade (MOODY; LAIMINS, 2010).

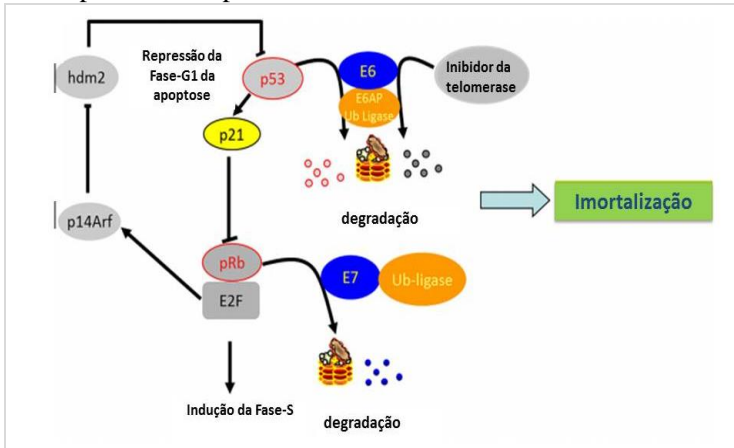
A infecção pelo HPV de alto risco oncogênico e a interação dos produtos dos genes precoces E6 e E7, as oncoproteínas virais E6 e E7 compõem o evento inicial na transformação celular. O genoma do HPV interage com as proteínas da célula do hospedeiro rompendo algumas funções biológicas e causando desequilíbrio na expressão das oncoproteínas E6 e E7 nas células basais. As oncoproteínas E6 e E7 atuam sobre proteínas supressoras de tumor, ou seja, a p53 e a proteína do retinoblastoma pRb, respectivamente. Normalmente, a ligação da pRb com o fator de transcrição E2F bloqueia a ativação do ciclo celular. Nas células em replicação, o E2F é regulado pela fosforilação da pRb. A fosforilação da pRb é normalmente inibida pelas quinases ciclina-dependentes (Cdk) (HAEDICK; IFTNER, 2013).

A oncoproteína E7 interage com a pRb de forma análoga à fosforilação mediada pelas Cdk, promovendo sua degradação (GIARRÉ et al., 2001; DOORBAR, 2006). Isso resulta na liberação de E2Fs e ativação do ciclo celular, estimulando o avanço da célula para a fase S. Em células normais, isso seria contrabalanceado pela ativação da p53 com consequente ativação da via de apoptose da célula. Entretanto, a E6 aumenta a degradação da p53 impedindo a apoptose (HAEDICKE; IFTNER, 2013).

A habilidade em promover a degradação da p53 é uma propriedade exclusiva da E6 de HPVs de alto risco, ressaltando a importância deste evento na carcinogênese induzida pelo vírus (MANSOUR et al., 2007; DOORBAR, 2006). Com o E2F livre a E7-dependente não é mediada pela fosforilação da pRb, a regulação pelas ciclinas não tem efeito no ciclo celular ativado. Como consequência, ocorrerá sobre-expressão de p16^{INK4a} (expressa para induzir a apoptose), pela perda da repressão habitualmente mediada pelo complexo pRb/E2F e pela forte ativação da E2F livre. Já que as ciclinas não sofrem inibição pela p16^{INK4a}, os genes da fase S (fase do ciclo celular em que ocorre a síntese de DNA) são continuamente ativados, imortalizando a célula (SANO et al. 1998; WANG et al., 2004; MANSOUR et al., 2007).

Outra função de E6 é a ativação da enzima telomerase promovendo mecanismo de imortalização celular (Figura 4) (HAEDICKE; IFTNER, 2013).

Figura 4: O Papel de E6 e E7 de HPV de alto risco no ciclo celular da célula hospedeira. Adaptado de HAEDICKE E IFTNER, 2013.



3.1.5 História natural da infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV pode ser clínica, subclínica ou latente. A infecção latente apresenta-se sem crescimento ou evidências microscópicas da presença do vírus. A infecção subclínica é marcada por uma manifestação clínica discreta e sua visualização requer equipamento para melhor examinar a região. A infecção clínica é definida pela presença de lesões. A regressão espontânea pode ocorrer em qualquer fase da evolução (PASSOS et al., 2008).

Adolescentes e mulheres jovens, com idade inferior a 30 anos, são mais predispostas à infecção pelo HPV. Durante a puberdade, ocorre o processo denominado de metaplasia escamosa que consiste na transformação do epitélio colunar em epitélio escamoso. Neste processo, grandes áreas escamosas, glandulares e metaplásicas de transição são formadas e favorecem a infecção pelo HPV. Achados histológicos e colposcópicos demonstram que a imensa maioria das transformações epiteliais iniciais do colo desenvolve-se na zona de transformação onde

ocorre a junção dos epitélios escamoso e cilíndrico (GOMPEL; KOSS, 1997; MOSCICKI, 2005).

Entretanto, a maioria das infecções por HPV são transitórias (WANG, 2007), e verrugas genitais clinicamente significativas irão se formar em cerca de 1% dos indivíduos infectados com HPV 6 e 11 (URMAN; GOTTLIEB, 2008). Aproximadamente 70% das novas infecções resolvem-se dentro de um ano, e 91% dentro de dois anos (WANG, 2007). Somente 25% de todas as mulheres infectadas com HPV de alto risco irão desenvolver neoplasia intraepitelial cervical e menos de 1% vai desenvolver câncer cervical invasivo (WANG, 2007; URMAN; GOTTLIEB, 2008; MALIK et al., 2013).

O HPV oncogênico é causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical, pois se admite que outros fatores conjuntamente com o vírus modulem o risco de transição da infecção cervical para a malignidade (CASTELLSAGUÉ et al., 2002; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003). Esses fatores envolvem o início precoce da atividade sexual, número de parceiros, parceiros sexuais recentes, e a ocorrência de parceiros que fazem sexo com outros parceiros (VELDHUIJZEN et al., 2010), o tabagismo, a baixa ingestão de vitaminas, o descaso no reconhecimento de sinais e sintomas da doença, a inflamação crônica da cérvix, a promiscuidade, o uso de contraceptivos orais e de DIU em detrimento do condom, a coinfeção por agentes infecciosos, tais como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), infecção por CT e Herpes Vírus simples tipo 2 (SILVA FILHO; LONGATTO FILHO, 2000; NONNENMACHER et al., 2002; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003; STEBEN; FRANCO, 2007; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

O carcinoma do colo de útero é mais frequente em mulheres com idade superior a 35 anos, com um pico de incidência na faixa etária de 45 a 49 anos, sobretudo porque o tempo médio entre a infecção inicial e a manifestação do câncer cervical é de pelo menos 15 anos (MOSCICKI, 2005; CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006, NADAL; MANZIONE, 2006).

3.1.6 História natural da infecção pelo HPV e carcinogênese cervical

O câncer cervical tem início na zona de transformação ou Junção Escamo Colunar (JEC). A zona de transformação é um tecido que circunda o canal cervical e está localizado onde as células do

epitélio escamoso da vagina se encontram com as células do epitélio glandular do canal endocervical. Os HPVs oncogênicos têm tropismo por células do epitélio metaplásico desse local, as infectam e podem induzir sua transformação a células neoplásicas (MUNOS et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2010).

O desenvolvimento do câncer cervical é um evento que culmina de um longo processo de décadas, que tem início por meio da infecção aguda com um ou mais tipos de HPV oncogênicos, acompanhado de persistência viral detectável, progredindo para lesões pré-neoplásicas e carcinoma *in situ* ou invasor. No entanto, pode ocorrer espontaneamente com a regressão das lesões pré-neoplásicas e com a eliminação da infecção pelo HPV (MUNOS et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2008).

Segundo Rodriguez e colaboradores (2008), metade das novas infecções por HPV são indetectáveis num período de aproximadamente 6-12 meses e mais de 90% das infecções serão eliminadas em poucos anos. A taxa de eliminação da infecção é alta nos primeiros meses após a infecção, mas diminui ao longo do tempo (PLUMMER et al., 2007).

Quando um tipo de HPV oncogênico é detectado pelo teste de HPV, uma anormalidade citológica concomitante estará presente em cerca de um quarto ou um terço do tempo da infecção. A maior parte destas anormalidades é equívoca ou no máximo, de pouca importância. Quando se compara uma infecção, levando-se em consideração o tipo de HPV oncogênico, alterações citológicas mais graves serão mais prováveis em mulheres infectadas com HPV 16. Em geral, o aparecimento das alterações citológicas e histológicas decorrentes de uma infecção por um HPV oncogênico são tardias quando comparadas à detecção do DNA do HPV, que pode ser feita de forma precoce e permanece evidenciada por um período maior (SCHIFFMAN et al., 2002). No entanto, essas diferenças temporais sutis passam despercebidas pelos atuais programas de rastreio para o câncer do colo do útero (SCHIFFMAN et al., 2011).

Detalhes sobre a resposta imune mediada por células que resulta na eliminação da infecção pelo HPV e sua associação com as alterações citológicas permanecem desconhecidos (STANLEY, 2006). A eliminação aparente do HPV produz uma proteção celular e/ou humoral de longo prazo frente à reinfeção com o mesmo tipo viral, contudo, não se sabe se a proteção é para a vida toda. Embora o termo eliminação da infecção pelo HPV seja utilizado quando um tipo de HPV não pode ser

detectado, sabe-se que ele pode não ter sido completamente eliminado, e pouco se sabe sobre seu estado de latência (SCHIFFIMAN et al., 2011).

A reativação do HPV do seu estado de “latência” pode ocorrer mesmo na ausência de imunossupressão definitiva (GONZALEZ et al., 2010). Ela é comum, especialmente em mulheres mais velhas, entretanto, as lesões desenvolvidas provavelmente serão benignas. Em um robusto estudo desenvolvido na Costa Rica por Rodriguez e colaboradores (2010), não foram observados casos de reaparecimento do mesmo tipo de HPV com posterior persistência e evolução a NIC III.

Em contraste com as infecções que são eliminadas, as que permanecem detectáveis por poucos anos, tem um aumento de 5% no risco de desenvolvimento do câncer. A infecção persistente por HPV está associada a um risco absoluto alto (maior que 40% para persistência da infecção por HPV 16) para o diagnóstico tardio de lesões precursoras do câncer (NIC III). O aparecimento de lesões clínicas em mulheres com infecção persistente por HPV é gradual (SCHIFFIMAN; RODRIGUEZ, 2008); lesões com proliferação celular anormal ocupando o terço inferior do epitélio são classificadas como NIC I, proliferação celular anormal ocupando dois terços do epitélio são classificadas como NIC II, lesões com proliferação celular anormal ocupando mais de dois terços do epitélio são classificadas como NIC III (RICHARD, 1967).

Lesões classificadas como NIC III, que inicialmente estão limitadas a apenas algumas células neoplásicas são sutis demais para um diagnóstico citológico e colposcópico. As lesões NIC III crescem de forma lenta e gradual dentro do epitélio ao longo de vários anos antes de tornarem-se invasivas (SCHIFFIMAN; RODRIGUEZ, 2008). Não é possível prever se ou quando as lesões NIC III irão tornar-se invasivas. Os atuais métodos e intervalos de rastreio não conseguem identificar o momento exato em que células persistentemente infectadas irão evoluir para uma lesão NIC III suficientemente extensa para um diagnóstico (SCHIFFIMAN et al., 2011).

3.1.7 Prevalência da infecção pelo HPV e câncer cervical

O HPV se constitui a DST mais prevalente no mundo. Estima-se que mais de 70% das mulheres sexualmente ativas poderão estar infectadas por um ou mais tipos de HPV ao longo da vida. Entretanto, 80% das infecções são transitórias e são eliminadas pelo sistema imune

sem levar à lesão. Os outros 20% podem progredir para lesões precursoras do câncer cervical (ALBA et al. 2009).

A curva de prevalência da infecção pelo HPV tem um comportamento em forma de “U”, onde se observa uma elevada prevalência em mulheres jovens, sexualmente ativas, seguida por um declínio significativo e posterior aumento na prevalência após os trinta anos de idade. Em outros casos, a prevalência da infecção pelo HPV é alta em mulheres jovens e permanece constante com a idade. Fatores que potencialmente contribuem para o aumento da prevalência em mulheres maduras são: exposição contínua a novos parceiros sexuais, reaparecimento da infecção latente ou quiescente, alterações na imunidade, como o declínio da função imune e hormonal em idades mais avançadas, imunossupressão causada por coinfeção com outros agentes virais ou parasitários e cofatores relacionados à microbiota cérvico vaginal e pH (WHEELER, 2013).

A prevalência da infecção subclínica pode chegar a 40% em mulheres que estão em épocas de maior atividade sexual. Nos últimos anos, ocorreu um aumento significativo da prevalência das infecções clínicas como o condiloma acuminado e sua forma de expressão subclínica. As formas clínicas, frequentemente causadas por tipos de HPV de baixo risco oncogênico tendem a ser benignas. Estima-se que uma em cada dez pessoas sexualmente ativas será acometida por verrugas genitais durante a sua vida, sendo que o HPV 6 e 11 são relacionados com 90% das verrugas genitais (RODRÍGUEZ-CERDEIRA, 2008; ALBA et al., 2009).

A prevalência mundial da infecção pelo HPV é estimada em cerca de 440 milhões (desses, 291 milhões são em mulheres), tendo causado 510.000 casos de câncer cervical e aproximadamente 288.000 mortes somente no ano de 2012 (MALIK et al., 2013). O HPV é responsável por cerca de 50% dos casos globais de DST (WHO, 2013). Na Europa, o câncer cervical é o segundo mais incidente entre mulheres jovens, atrás apenas do câncer de mama (RAMET et al., 2011). Nos Estados Unidos, são diagnosticados anualmente aproximadamente 6 milhões de novos casos de infecção pelo HPV. Avalia-se que naquele país pelo menos 50% da população sexualmente ativa é suscetível a se infectar com o vírus HPV pelo menos uma vez na vida (DUNNE et al. 2007). Estima-se que o câncer cervical acometa aproximadamente 500.000 mulheres a cada ano e mais de 85% dos casos de câncer do colo

do útero que ocorrem nos países em desenvolvimento, os quais concentram 82% da população mundial (DE MARTEL et al., 2012).

No Brasil, estima-se que 9 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HPV e que, a cada ano, 700 mil novos casos surjam. Ocorrem no país cerca de 20.000 casos de câncer cervical e 4.000 mortes por ano, com um risco médio estimado de 19 casos para 100 mil mulheres (GIRALDO et al., 2008). Para o Brasil, no ano de 2012, esperou-se 17.540 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (FACINA, 2011). O risco para infecção pelo HPV é de no mínimo 50%, independente do sexo. Aos 50 anos, ao menos 80% das mulheres terão adquirido em algum momento de sua vida a infecção genital pelo HPV (GIRALDO et al., 2008). Na análise regional no Brasil, o câncer do colo do útero se destaca como mais incidente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (FACINA, 2011).

3.1.8 Vacinas

A prevenção da infecção é uma alternativa atrativa e desejável para o controle da incidência da doença. Atualmente existem duas linhas de pesquisa, as vacinas terapêuticas e as vacinas profiláticas. As vacinas terapêuticas baseiam-se na indução da resposta imune celular contra células que expressam antígenos virais, objetivando a regressão das lesões associadas ao HPV. As proteínas E6 e E7 são fortes candidatas como alvos da maioria destas vacinas, uma vez que são expressas constantemente nas células de tumores associados ao HPV (MANTOVANI; BANKS, 2001; MUNGER, 2001; NADAL; MANZIONE, 2006).

As vacinas profiláticas são baseadas na indução da resposta imune humoral. Para isso, os antígenos utilizados baseiam-se na proteína estrutural do capsídeo viral L1. As vacinas formam uma estrutura semelhante ao vírus e são destituídas de material genético, por isso, são consideradas seguras, pois induzem uma forte resposta imune sem risco de infecção. Essas partículas semelhantes ao vírus foram denominadas de VLPs (*Vírus Like Particles*) e baseiam-se na tecnologia do DNA recombinante e engenharia genética, em que as VLPs são produzidas utilizando-se células de insetos e/ou de leveduras (VILLA et al., 2005; LOWY; SCHILLER, 2006).

A agência de regulamentação de medicamentos *Food and Drug Administration* (FDA-EUA) no ano de 2006 aprovou a comercialização da vacina quadrivalente (Gardasil[®]), produzida pelo Laboratório Merck & Co, Inc. No mesmo ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a sua comercialização no Brasil (VESPA JÚNIOR, 2006). A vacina possui as VLPs dos quatro principais tipos de HPV que infectam a mucosa genital (HPV 6, 11, 16 e 18) (VILLA et al., 2005). Ela é indicada para meninas e mulheres de 9 a 26 anos na prevenção do câncer do colo do útero, do ânus, da vulva e da vagina, causados pelos HPVs 16 e 18, verrugas genitais, causadas pelos HPVs 6 e 11, lesões intraepiteliais cervicais, vulvares e anais, além do adenocarcinoma de colo do útero. É indicada também para meninos e homens de 9 a 26 anos, na prevenção de câncer de ânus causados pelos tipos 16 e 18, verrugas genitais causadas pelos tipos 6 e 11 e lesões pré-cancerosas, causadas pelos tipos 6, 11, 16 e 18. A vacina é administrada num regime de três doses durante 6 meses (1º dia, 2º mês e 6º mês) (FDA, 2006).

Outra vacina profilática é a vacina bivalente (Cervarix[®]) produzida pela GlaxoSmithKline contra os tipos virais 16 e 18. Essa foi aprovada pela ANVISA no ano de 2008 para comercialização no Brasil. Ela é composta por VLPs formadas pelas proteínas L1 dos HPVs 16 e 18, conferindo proteção contra a infecção dos tipos de HPV 16 e 18, principais tipos envolvidos na carcinogênese genital (PASSOS et al., 2008). O FDA aprovou essa vacina para meninas e mulheres de 9 a 25 anos de idade na prevenção de lesões precursoras da malignidade e do câncer cervical, ambos causados pelos tipos de HPV 16 e 18. Também é administrada em três doses (1º dia, 1º mês e 6º mês) (CDC, 2010).

O CDC (*Centers for Diseases Control e Prevention/EUA*) recomenda esquemas de imunização rotineiros com qualquer uma das duas vacinas em meninas e meninos de 11 e 12 anos. Entretanto, a vacinação pode iniciar a partir dos nove anos de idade. A vacina quadrivalente é também recomendada para indivíduos de ambos os sexos na faixa etária de 13 a 26 anos. Esquemas de imunização também são recomendados para homens que fazem sexo com homens e pessoas imunocomprometidas com idade entre 12 a 26 anos (CDC, 2012).

Ambas as vacinas têm alta eficácia frente a lesões pré-cancerosas causadas pelos HPVs 16 e 18. A vacina quadrivalente também apresentou eficácia elevada contra verrugas genitais causadas pelos HPVs 6 e 11 e lesões pré-cancerosas vulvar e vaginal (CDC, 2010). O estudo PATRICIA, desenvolvido para verificar a atividade

protetiva da vacina bivalente frente à infecção pelo HPV, demonstrou que a eficácia da vacina contra NIC II+ associada com HPVs 16/18 é de 92,9%, NICII+ associado à HPV 16, de 95,7% e NICII+ associado à HPV 18, de 86,7%. A eficácia da vacina foi de 54% contra NIC II+ associada com doze tipos oncogênicos não incluídos na vacina. Também foram observados resultados de proteção cruzada contra NICII+ associado aos tipos de HPV 31, 33 e 45 (PAAVONEN et al., 2009).

A vacina quadrivalente demonstrou 98,2% de eficácia na prevenção de NIC II/III e de adenocarcinoma invasivo causados pelos tipos de HPV 16 e 18. Quando analisados separadamente a eficácia na prevenção das NIC II/III e adenocarcinoma invasivo causado pelo HPV foi de 100,% para o HPV 18 e 97,6% para o HPV 16. A vacina quadrivalente apresentou eficácia de 100% na prevenção de lesões classificadas como Neoplasias Intraepiteliais Vulvares-VINII/III ou Neoplasias Intraepiteliais Vaginais- VAINII/III, causadas pelos tipos de HPV 6, 11, 16 e 18 (KAJER et at.; 2009). Em relação à prevenção das verrugas genitais relacionadas aos tipos de HPVs 6 e 11, a vacina apresentou 99% de eficácia (FDA, 2013).

Em 1º de julho de 2013, o Ministério da Saúde anunciou a incorporação da vacina quadrivalente contra o HPV ao Sistema Único de Saúde (SUS), objetivando a prevenção do câncer do colo do útero (BRASIL, 2013a). A vacina contra o HPV será ofertada para meninas e pré-adolescentes entre 09 e 13 anos nas unidades básicas de saúde e também em escolas públicas e privadas, de forma articulada com as unidades de saúde de cada região. No entanto, a sua implantação será gradativa. Em 2014, a população alvo da vacinação contra HPV será composta por adolescentes do sexo feminino na faixa etária de 11 a 13 anos. Em 2015, serão vacinadas as adolescentes na faixa etária de 9 a 11 anos e a partir de 2016, serão vacinadas as meninas de 9 anos de idade (BRASIL, 2014).

De acordo com dados divulgados pelo Ministério da Saúde, a meta é vacinar pelo menos 80% do grupo alvo, que, em 2014, é de 5,2 milhões de adolescentes de 11 a 13 anos. Cada menina deve receber três doses da vacina para estar imunizada contra o HPV. Após a primeira dose, a segunda deverá ocorrer em seis meses. E a terceira, 60 meses após a primeira dose (5 anos) (BRASIL, 2014).

3.1.9 Métodos de diagnóstico para o HPV

A necessidade de se fazer diagnóstico e tratamento precoce em lesões pré-malignas causadas pelo HPV consiste em prevenir a progressão ao câncer. Estudos indicam a elevação das taxas de progressão das lesões conforme o aumento do tempo das infecções. No prazo de um ano, o risco de progressão da lesão moderada para lesão severa é de 1%; em dois anos, esse valor sobe para 16%; e num prazo de cinco anos, o risco eleva-se para 25% (CAVALCANTI ;CARESTIATO, 2006).

O diagnóstico do HPV restringiu-se primeiramente à citopatologia e à histopatologia, até que foram desenvolvidos os métodos de biologia molecular capazes de detectar o genoma do HPV e seus transcritos em amostras clínicas (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006). A citopatologia e a histologia são consideradas métodos de diagnóstico indiretos, pois não detectam a presença do vírus, mas alterações celulares e histológicas da infecção pelo HPV (IARC, 2007). Os métodos moleculares, considerados diretos, apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de serem seguros, reprodutíveis, de baixo custo e automatizados. Portanto, a busca de novas técnicas de detecção que possam ser usadas no rastreamento das infecções causadas por HPV continuam sendo objeto de estudo (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006).

3.1.9.1 *Diagnóstico Morfológico*

3.1.9.1.1 Exame citopatológico

A primeira forma de detecção de alterações compatíveis com a infecção pelo HPV foi à coloração pelo método de Papanicolaou, introduzida no ano de 1949, antes mesmo da causa do câncer cervical ser conhecida. Até hoje, é o teste utilizado no rastreamento de lesões precursoras do câncer do colo do útero nos programas de triagem, tendo em vista a sua grande abrangência, o baixo custo e a facilidade de execução (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006).

O exame citopatológico é baseado em esfregaços celulares cervicais (ectocervice e endocervice) fixados em lâmina e posteriormente corados. A observação de alterações celulares típicas como presença de coilócitos, disqueratose e anomalias celulares

compatíveis com a infecção pelo HPV é definida em graus variados. Atualmente, a classificação das características celulares encontradas nos esfregaços é baseada no Sistema Bethesda versão 2001, no qual as atipias em células escamosas (ASC) são subdivididas em duas categorias: atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e atipias em células escamosas de significado indeterminado, não podendo descartar lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H). As classificações em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e carcinoma escamoso foram conservados da classificação anterior (Sistema Bethesda – EUA 1988). Entre as atipias glandulares, são consideradas aquelas de significado indeterminado e o adenocarcinoma (*in situ* e invasor) (SOLOMON; NAYAR, 2004).

A recomendação do intervalo de rastreamento e cobertura do público alvo varia de acordo com o protocolo de cada país. No Brasil, a recomendação do Instituto Nacional de Câncer/MS - INCA é que o exame citopatológico deve ser priorizado para mulheres de 25 a 64 anos, uma vez por ano e, após dois exames citológicos anuais consecutivos negativos, o intervalo passa a ser de três anos. No ano de 1998, o Ministério da Saúde implantou o programa nacional de controle do câncer do colo do útero, denominado “Viva Mulher” que visava reduzir as taxas de morbi-mortalidade decorrentes desta neoplasia (BRASIL, 2013b).

Entretanto, o exame citopatológico apresenta um número elevado de resultados falso-negativos que varia em torno de 15% a 50% e percentuais de resultados falso-positivos de 10% em média, que correspondem a uma sensibilidade de 50% a 90% e especificidade de 70% a 90% (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006). Essa grande variabilidade pode ser explicada pela dificuldade de uma coleta representativa dos dois epitélios e a falta de reprodutibilidade interobservador na leitura da lâmina visto a natureza subjetiva da interpretação (KITCHENER; CASTLE, COX, 2006). Mesmo assim, ao longo dos anos, os países desenvolvidos que adotaram o exame nos programas de triagem como medida preventiva, observaram grande diminuição do número de casos de cânceres cervicais (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006).

3.1.9.1.2 Histopatologia

O diagnóstico histopatológico é realizado com amostras coletadas da lesão e está baseado em critérios morfológicos da arquitetura tecidual, sendo considerada a técnica padrão ouro do diagnóstico morfológico. Esse exame é realizado em amostras retiradas de uma área suspeita da presença de lesão (PIAS *et. al.*, 2009). Para esse exame, é utilizada a classificação de Richart, que divide as lesões intraepiteliais em três graus: NIC I, proliferação celular anormal ocupando o terço inferior do epitélio; NIC II, proliferação celular anormal ocupando dois terços do epitélio, NIC III; proliferação celular anormal ocupando mais de dois terços do epitélio. (RICHARD, 1967).

3.1.9.2 Diagnóstico molecular

A descoberta de que as infecções cervicais persistentes por genótipos específicos do HPV causam praticamente todos os cânceres do colo do útero e suas lesões precursoras revolucionaram as estratégias de prevenção e rastreamento, visando detectar diretamente o agente causal. Neste contexto, os testes moleculares mostram-se como estratégias promissoras de rastreio primário, principalmente em mulheres mais velhas que possuem um risco maior para o desenvolvimento do câncer cervical (CASTLE; CREMER, 2013).

A detecção do HPV em células cervicais tornou-se o foco de interesse na comunidade científica e promoveu mudanças nos *guidelines* para rastreio do HPV. Em 2003, o FDA Americano (*Food and Drug Administration* – EUA) aprovou o uso dos testes moleculares para detecção do HPV na triagem de mulheres com resultados de ASC-US no exame citopatológico, a fim de estabelecer a decisão de encaminhamento para a colposcopia, e em mulheres com idade superior a 30 anos, em conjunto com a citologia, para avaliar a presença ou ausência dos tipos de HPVs de alto risco, uma vez que a infecção que acomete mulheres mais jovens tende a curar espontaneamente (CASTELLSAGUÉ, 2008; CASTLE et al, 2008).

Os métodos moleculares utilizados para detecção do HPV incluem: os baseados na hibridização direta do DNA ou RNA viral presente nas amostras como *Southern blot*, *dot blot*, hibridização *in situ* com fluorescência (FISH); os baseados na amplificação de sinal como a Captura Híbrida II (CH2); os baseados na amplificação *in vitro* destes

genomas como a PCR, seguida por sua identificação tipo-específica, por hibridização ou mapeamento por digestão do DNA viral por enzimas de restrição (ROSENBLATT et al., 2005); os baseados na identificação do RNAm viral das proteínas oncogênicas E6 e E7 e o sequenciamento do DNA (HUBBARD, 2003; HAWS et al., 2004; LIE et al., 2005; MOLIJN et al., 2005; VILLA; DENNY, 2006; GASPEROV et al., 2008; JEANTET et al., 2009).

3.1.9.2.1 Captura Híbrida

A Captura Híbrida (HC) é um método baseado na hibridização de sondas sintéticas de RNA complementares às sequências genômicas de 13 tipos de HPV de alto risco – grupo A (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e 5 tipos de baixo risco- grupo B (HPV 6, 11, 42, 43, 44). O DNA presente na amostra é hibridizado em solução que permite a formação de híbridos específicos DNA HPV/RNA da sonda. Em seguida, os híbridos são reconhecidos por anticorpos adsorvidos sobre poços de uma placa, que são capazes de reconhecer de forma específica híbridos DNA/RNA. Após a ligação com o anticorpo, os híbridos de DNA/RNA imobilizados são detectados com uma série de reações que liberam luz que pode ser detectada por luminômetro. A intensidade de luz emitida é medida em Unidade de Luz Relativa (RLU), essa é proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra e fornece uma medida semi-quantitativa da carga viral. A sensibilidade do método é de 1pg DNA HPV, equivalente a 5.000 cópias do genoma. Um resultado positivo não fornece informações sobre o tipo específico de HPV detectado, apenas permite dizer que pertence ao grupo de alto ou baixo risco (BHATLA et al., 2012).

Em 2000, o FDA aprovou HC2 como teste de triagem para mulheres com resultados de citologia de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) com o intuito de determinar o encaminhamento para colposcopia. Em 2003, a HC2 foi aprovada para utilização em conjunto com o exame de Papanicolaou em mulheres com idade superior ou igual a 30 anos para avaliar a ausência ou presença de tipos de HPV de alto riscos (FDA, 2003). O teste HC2 é atualmente considerado o padrão de referência para o teste de HPV (BHATLA et al., 2012).

3.1.9.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Este método é baseado na amplificação de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias dessa sequência. Essa técnica foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e literalmente revolucionou a genética molecular. A síntese do DNA do HPV é feita a partir de uma fita simples de DNA que é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA polimerase, que adiciona nucleotídeos presentes na reação segundo a fita-molde. Oligonucleotídeos iniciadores, ou iniciadores, pequenos segmentos de nucleotídeos (*primers*) são requeridos para indicar à DNA polimerase o início da sequência a ser amplificada. Dessa forma, a região do DNA HPV a ser sintetizada é definida pelos *primers*, que pareiam especificamente às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar (SNIJDERS *et al.*, 2010).

Existem conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores que são capazes de detectar múltiplos tipos de HPV em um único ensaio. Estes são baseados na seleção de oligonucleotídeos iniciadores consensos dirigidos contra as sequências altamente conservadas do genoma de HPV, quase exclusivamente dentro das janelas de leitura aberta do gene L1 ou E1. Dentre os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores mais utilizados, pode-se destacar os oligonucleotídeos iniciadores degenerados MY09/11 (MANOS *et al.*, 1989) e sua versão modificada PGMY09/11 (GRAVITT *et al.*, 2000); o par de oligonucleotídeos iniciadores consenso GP5/6 e sua versão estendida GP5^{+/6⁺} (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995), e os oligonucleotídeos iniciadores SPF10 (KLETER *et al.*, 1999).

A análise dos produtos amplificados pode ser feita por diversas técnicas incluindo a eletroforese em gel de agarose, a hibridização tipo específica, ou ainda o sequenciamento direto do DNA. A sensibilidade e especificidade da PCR podem variar dependendo dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, do tamanho do produto, das condições da reação, da eficiência da DNA polimerase empregada e da habilidade para detecção de vários tipos virais (ROSENBLATT *et al.*, 2005).

3.1.9.2.3 PCR em tempo real (*Real time PCR*)

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto a amplificação acontece. O resultado deste método se baseia na detecção do momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo ultrapassa um limite de detecção denominado *cutt-off/ threshold*, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos (ponto final). Quanto maior o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, menor será o número de ciclos necessários para a amplificação superar o *cutt-off/ threshold*. Existem vários sistemas de detecção dos produtos da PCR em tempo real, entre estes, os mais empregados são o sistema de sondas fluorescentes Taqman® e o sistema do corante intercalante de DNA SYBR® Green I (BUSTIN, 2006).

3.1.9.2.4 PCR-RFLP (*PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Após a amplificação, os produtos da PCR podem ser submetidos à digestão enzimática. A digestão dos amplificados com endonucleases de restrição gera uma série de fragmentos que podem ser separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, corados com intercalante de DNA (Brometo de Etídio) e visualizados em luz ultravioleta. A interpretação dos tamanhos dos fragmentos gerados pode ser realizada com algoritmos descritos na literatura (MOLIJN et al., 2005).

Bernard e colaboradores (1994) desenvolveram uma metodologia baseada na técnica de PCR-RFLP para identificação de genótipos de HPV que infectam o trato anogenital. A metodologia é baseada na amplificação de um fragmento de 450 pares de base (pb) do gene L1 do HPV utilizando-se os iniciadores MY0911 ou PGMY0911 e posteriormente análise de restrição por RFLP com sete enzimas: *BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI*, *RsaI*, e *SauIII*.

Nobre e colaboradores (2008) na tentativa de simplificar a genotipagem por PCR-RFPL desenvolveram um algoritmo, também baseado na amplificação do fragmento de 450 pb do gene L1 do HPV utilizando os iniciadores MY09/11, entretanto com quatro enzimas de restrição *PstI*, *HaeIII*, *DdeI* e *RsaI*.

O RFLP pode identificar 43 tipos diferentes de HPV e 2 subtipos (HPV 6b, 11, 13, 16, 18, 26, 30–35, 39, 40, 42–45, 51–59, 61, 62, 64, 66–73, 81–84 e 89) (GASPEROV *et al.* 2008).

A PCR combinada com a metodologia RFLP demonstra ser um método sensível e financeiramente vantajoso para detectar o DNA e tipar HPV em amostras clínicas. (LUNG *et al.*, 1992; NOBRE *et al.*, 2008).

3.1.9.2.5 Hibridização reversa

A hibridização reversa é uma metodologia baseada na hibridização simultânea de um produto de PCR com múltiplas sondas, permitindo assim a detecção de diversos tipos de HPV em uma única reação e requerendo apenas uma pequena quantidade de produto da PCR. Durante a PCR, formam-se amplificadores biotinilados, que posteriormente são desnaturados sob condições alcalinas e hibridizados com sondas específicas em membrana de nitrocelulose. Após a hibridização e lavagem, os híbridos podem ser detectados pela adição de um conjugado e substrato, gerando o aparecimento de colocação na linha da sonda (teste), que pode ser visualizada e interpretada (MOLIJN *et al.*, 2005).

O Linear Array[®] HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA) é um método baseado na PCR com detecção por hibridização, que possui poder discriminatório de 37 genótipos diferentes do HPV. Esses são classificados como 15 genótipos de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), três genótipos prováveis de alto risco (HPV 26, 53, 66), 10 genótipos de baixo risco (HPV6, 11, 40, 42, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108) e nove genótipos de risco indeterminado (HPV55, 62, 64, 67, 69, 71, 83, 84, IS39) (DALSTEIN *et al.*, 2009).

O teste utiliza *primers* PGMY09/11 biotinilados para amplificar o fragmento de 450 pb correspondente a uma região polimórfica L1 do genoma do HPV. A reação é realizada em quatro etapas: preparo da amostra, amplificação pela PCR do DNA alvo, hibridização dos produtos amplificados com sondas específicas fixadas em linhas paralelas em fitas de membrana de nylon e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda por determinação colorimétrica. Como controle da extração do DNA e eficiência da amplificação, é utilizado

um par de *primers* da β -globina humana que amplifica um fragmento de 268 pb (DALSTEIN *et al.*, 2009).

Line Probe Assay (INOLiPA) é um teste qualitativo capaz de detectar de forma rápida e simultânea 28 diferentes tipos de HPV (HPV-6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74 e 82). A técnica baseia-se na amplificação de um pequeno fragmento de 65 pares de base da região L1 do HPV, utilizando-se os iniciadores biotinilados SPF10. O amplificado é desnaturado e hibridizado a sondas tipo específicos, imobilizados em linhas paralelas em uma membrana de nitrocelulose. Os híbridos assim obtidos são detectados com adição de um conjugado contendo estreptavidina e substrato, o que resulta na formação de um precipitado de cor púrpura no local da sonda. O padrão de hibridização é comparado com um modelo, sendo então identificados os tipos específicos do HPV presentes na amostra (KLETER *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 2001). O gene humano HLA-DPB1 é amplificado simultaneamente como controle interno da reação para verificar a qualidade do DNA e a presença de inibidores da PCR.

3.1.9.2.6 *Microarray* (Microaranjos de DNA ou Chips de DNA)

O Papillocheck[®] (Greiner bio-one[®]) é um teste que utiliza a tecnologia DNA-Arrays para detecção e genotipagem simultânea de 24 genótipos diferentes de HPV. Dentre eles, 15 genótipos são classificados como de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), dois provavelmente de alto risco (HPV 53 e 66) enquanto sete são de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44 e 70) (DALSTEIN *et al.*, 2009).

O ensaio baseia-se na detecção de um fragmento do gene E1 dos 24 genótipos diferentes de HPV. Após a extração do DNA, um fragmento de aproximadamente 350 pb do gene E1 é amplificado pela PCR na presença de um conjunto de *primers* específicos. Paralelamente, com o objetivo de evitar resultados falso-negativos, um fragmento do gene humano adenosina desaminase (ADA) é amplificado na reação e informa a qualidade da amostra e presença de inibidores. No segundo passo, os produtos amplificados são hibridizados com sondas específicas do DNA-chip. Cada lâmina de DNA-Chip contém 12 DNAArrays, permitindo a análise simultânea de 12 amostras. Durante a hibridização, o DNA é marcado com fluorescência e, posteriormente, o DNA não

ligado é lavado. A lâmina contendo os *DNAArrays* é escaneada automaticamente pelo CheckScanner™ e, em seguida, analisada e avaliada pelo CheckReport™ Software (DALSTEIN *et al.*, 2009).

3.1.9.2.7 Detecção do RNA mensageiro (RNAm) para as oncoproteínas E6 e E7

Embora a infecção por HPV de alto risco seja causa necessária para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, o processo oncogênico desencadeado por estes tipos de HPV na infecção persiste mediado pelo aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7. Assim, suas expressões precedem e são essenciais para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (RATNAM *et al.*, 2010).

O método NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) é baseado na amplificação isotérmica da sequência de ácidos nucleicos que utiliza sondas *molecular beacon* com detecção e genotipagem na mesma reação. Está disponível comercialmente nos testes PreTect HPV-Proofer (Norchip AS®, Klokkarstua, Noruega) e NucliSENS EasyQ HPV (BioMérieux® S.A., Marcy l'Etoile, França) (RATNAM *et al.*, 2010).

O PreTect HPV-Proofer é um ensaio multiplex em tempo real baseado na amplificação isotérmica e na detecção do RNAm de E6/E7 dos tipos de HPV de alto risco 16, 18, 31, 33 e 45 utilizando sondas *molecular beacons* (RATNAM *et al.*, 2010).

Em 2008, o APTIMA HPV Assay (Gen-Probe®, San Diego, CA, USA), outro método para detecção do RNAm E6/E7, foi lançado na Europa e aprovado pela Comunidade Européia (CE). Esse método é baseado na técnica da Amplificação Mediada por Transcrição - *Transcription Mediated Amplification* (TMA), onde a detecção do RNAm E6/E7 não discrimina os tipos e é feita por quimiluminescência, sendo capaz de identificar um *pool* de 14 genótipos de HPVs de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (SNIDJERS *et al.*, 2010).

O NucliSENS® EasyQ® detecta a expressão do mRNA de E6/E7 oncogênica dos cinco tipos de HPV de alto risco mais comuns, 16, 18, 31, 33 e 45. O teste pode ser usado para confirmação e estratificação de risco de indivíduos com infecção comprovada com HPV de alto risco (JEANTET *et al.*, 2009).

3.1.9.2.8 Sequenciamento

A genotipagem do HPV também pode ser feita a partir da análise da sequência de um produto de PCR que tem como alvo o genoma viral. A sequência nucleotídica do DNA obtida pode ser interpretada pela análise da homologia com um banco de dados que contenha todas as sequências dos diferentes genótipos do HPV. Existe uma base de dados disponível na internet que permite essa pesquisa e pode ser acessada livremente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. BLAST software) (ALTSCHUL et al., 1990) . A classificação formal dos genótipos é baseada na análise da sequência do genoma viral, enquanto a genotipagem de amostras clínicas é realizada através da análise de apenas um segmento, porém representativo do genoma viral (MOLIJN et al., 2005).

A genotipagem do HPV por sequenciamento apresenta-se limitada quando uma amostra clínica contém vários genótipos de HPV. As sequências que representam os tipos de HPV em menor quantidade no produto da PCR podem não ser detectadas pelo sequenciamento e subestimar a prevalência de infecções com múltiplos genótipos de HPV em estudos epidemiológicos e de acompanhamento (KLETER et al., 1999; MOLIJN et al., 2005).

3.2 *Chlamydia trachomatis*

As Clamídias são bactérias patogênicas intracelulares obrigatórias, gram-negativas e aeróbicas. Devido a sua incapacidade de sintetizar ATP (trifosfato de adenosina), precisam da energia da célula hospedeira para se replicar (MANAVI, 2006).

Taxonomicamente, as clamídias foram classificadas na ordem das *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, dentro de um único gênero, *Chlamydia* e quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. pecorum*, todas patogênicas para humanos. Elas são caracterizadas por um ciclo de desenvolvimento e grupo antigênico comum, mas são fenotípicas e patogenicamente diferentes (CHOROSZY-KRÓL et al., 2012).

As *Chlamydiae* sobrevivem replicando-se unicamente dentro de inclusões citoplasmáticas, possuem restrições metabólicas e são incapazes de sintetizar ATP, necessitando de fonte de energia externa. A

replicação apresenta um ciclo multifórmico e sem sincronismo (SCHACHTER; STAMM, 1999; MANAVI, 2006).

O gênero *Chlamydia* foi inicialmente classificado como vírus por apresentar ciclo biológico intracelular obrigatório (SCHACHTER; STAMM, 1999). Diferente dos vírus possui RNA, DNA e ribossomo típico de organismo procarioto. Por outro lado, apresenta duas unidades gênicas controladas por sequências regulatórias comuns (*operons*), o que torna CT diferente dos demais procariotos. Elas exibem similaridade morfológica e estrutural com bactérias gram-negativas, incluindo membrana trilaminar com lipopolissacarídeos e proteínas de membrana (COMANDUCCI, 1990; MOULDER, 1991; STEPHENS, 1998; SCHACHTER; STAMM, 1999; CHOROSZY-KRÓL et al., 2012). Seu ciclo de desenvolvimento é único e as diferencia de todos os outros microrganismos (MOULDER, 1991).

As cepas patogênicas de CT são divididas em 18 sorotipos baseados na reatividade imunológica da MOMP (*major outer membrane proteins*). Adicionalmente, os sorotipos de CT são classificados em dois grupos, o biotipo tracoma e biotipo linfogranuloma venéreo, baseados nas diferenças entre as doenças que produzem e nas características do crescimento em cultura de células. O biotipo tracoma inclui sorotipos que causam tracoma ocular (A, B, Ba, C) e sorotipos que causam doença urogenital (D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K) enquanto que o biotipo linfogranuloma venéreo inclui os sorotipos (L1, L2, L2a, e L3). Os sorotipos A, B, Ba e C, são transmitidos pelo contato direto e responsáveis pelo desenvolvimento do tracoma (STOTHARD et al., 2003; CHOROSZY-KRÓL et al., 2012). A relação das doenças humanas causadas por CT e seus sorotipos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Doenças causadas por *Chlamydia trachomatis* em humanos.

Sorotipo	Sexo	Doença
A, B, Ba, e C	Ambos	Trachoma, conjuntivite e queratite
	Feminino	Uretrite, cervicite, endometrite, salpingite e peri-hepatite
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	Masculino	Uretrite, prostatite, epididimite
	Ambos	Conjuntivite, proctite, Síndrome de Reiter
	Neonatos	<i>Oftalmia neonatorum</i> , pneumonia
L1,L2,L2a,L3	Ambos	Linfogranuloma venéreo

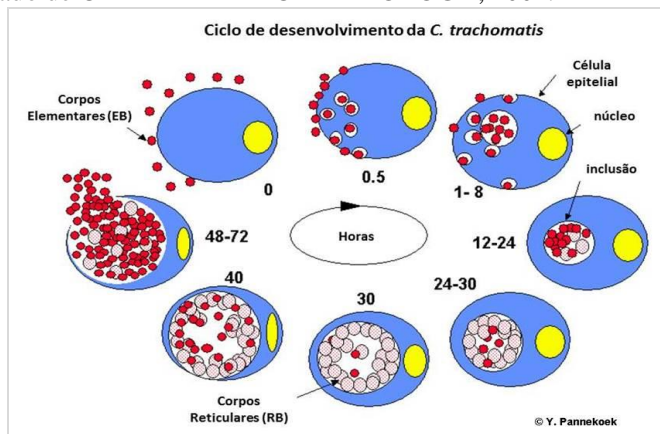
Fonte: STOTHARD et al., 2003; CHOROSZY-KRÓL et al., 2012

O genoma da CT é formado por um cromossomo circular com cerca de um mega base (mb) e um plasmídeo, denominado de plasmídeo críptico, de aproximadamente sete quilo bases (kb) (STEPHENS et al., 1998). Embora raros e encontrados apenas em sorotipos L2, D e E, já foram descritos na literatura isolados de *Chlamydia trachomatis* desprovidos de plasmídeo (PETERSON, et al., 1990; STOTHARD et al., 1998). Os plasmídeos isolados de CT são extremamente conservados, com menos de 1% de variação na sequência de nucleotídeos. Apresentam oito ORFs (fases de leitura aberta) intercaladas por quatro sequências curtas não codificantes de 22 pares de base em tandem na origem de replicação (COMANDUCCI et al., 1990; TAM et al.; 1992; SETH-SMITH, et al., 2009).

O ciclo da infecção por CT consiste em duas fases distintas. Uma fase elementar, ou infecciosa, e uma fase reticular ou de replicação. Os corpos elementares (EB) têm forma semelhante a uma lanceta, são metabolicamente inativos e responsáveis pela transmissão da infecção. Os corpos reticulares ou corpúsculos reticulares (RB), de formato oval, são metabolicamente ativos, não infecciosos e são formados após a infecção da célula onde se multiplicam formando corpos de inclusão no citoplasma da célula (MANAVI, 2006; CHOROSZY-KRÓL, et al., 2012).

O ciclo de desenvolvimento da CT tem início quando os EB são fagocitados por endocitose pelas células epiteliais colunares da conjuntiva e/ou órgãos genitais do hospedeiro. No citoplasma da célula, ocorre a formação de um fagossoma juntamente com EB, denominados de inclusões citoplasmáticas. Dentro das inclusões citoplasmáticas EB se transformam em RB por meio de uma reorganização da membrana e do genoma bacteriano. Os RB se multiplicam por divisão binária dentro do fagossoma e após 48 horas, em média, os RB se transformam em EB. Estes são liberados por ruptura ou lise do fagossoma sem danificar a célula hospedeira (MANAVI, 2006; CHOROSZY-KRÓL, et al., 2012).

Figura 5: Ciclo de desenvolvimento de *Chlamydia trachomatis*. Fonte: Adaptado de CHLAMYDIAL CELL BIOLOGY, 2004.



Darville and Hiltke (2010) descreveram duas hipóteses para a patogênese na infecção por CT: o paradigma celular e o paradigma imunológico. Do ponto de vista celular, a patogênese é impulsionada principalmente pela resposta inflamatória iniciada e propagada por células epiteliais do hospedeiro, os principais alvos da infecção por clamídia (STEPHENS, 2003). As células epiteliais infectadas secretam quimiocinas, que promovem o recrutamento de leucócitos para o local da infecção e citocinas que induzem e aumentam a resposta inflamatória celular (RASMUSSEN et al., 1997; STEPHENS, 2003). A infecção persistente pode levar à estimulação contínua de mediadores inflamatórios, levando à proliferação celular, reestruturação e dano tecidual (BRUNHAM; PEELING, 1994; GOTTLIEB et al., 2010).

De acordo com o paradigma imunológico, a patogênese é primeiramente resultado da resposta imune celular adaptativa em resposta a antígenos específicos da clamídia durante a persistência da infecção. As respostas celulares adaptativas frente à clamídia têm como objetivo eliminar a infecção, e caso isso não seja possível, na infecção persistente também induzem o dano tecidual (BRUNHAM; PEELING, 1994; GOTTLIEB et al., 2010).

Um dos pontos chaves para a compreensão da infecção é como as clamídias causam infecção persistente em humanos, induzem a imunopatogênese e ao mesmo tempo conseguem evadir-se do sistema imunológico por longos períodos. Outra questão importante relacionada

à patogênese da clamídia é qual a proporção do número de mulheres infectadas com CT que desenvolveram complicações patológicas (RANK; SANDERS, 1992; GOTTLIEB et al., 2010).

Embora numerosos estudos de caso-controle demonstrem a associação entre a infecção persistente por clamídia e infertilidade (ROBERSON et al., 1987, WHO, 1995) e/ou gravidez ectópica (BRUNHAM et al., 1992) os autores não encontram dados prospectivos que avaliem diretamente as taxas de complicações reprodutivas em longo prazo após a infecção tratada (GOTTLIEB et al., 2010).

Estudos da história natural da infecção por clamídia são difíceis, pois não fica claro há quanto tempo a mulher está infectada no momento da detecção da infecção pelos testes atualmente disponíveis e o manejo clínico é baseado no tratamento da infecção após o diagnóstico. Outro problema fundamental é a baixa sensibilidade e especificidade do diagnóstico clínico da Doença Inflamatória Pélvica (DIP), que muitas vezes é dependente da experiência do clínico. Entretanto, as técnicas de amplificação dos ácidos nucleicos, altamente sensíveis, podem detectar pequenas quantidades de DNA de CT e, portanto prever uma melhor probabilidade de progressão da infecção (GOTTLIEB et al., 2010).

Após o diagnóstico da DIP sintomática, uma em cada seis mulheres irá desenvolver problemas de infertilidade (WESTRO et al., 1992; NESS et al., 2002). Inúmeros estudos sugerem que a infecção persistente pela CT pode levar a complicações reprodutivas em longo prazo, tais como infertilidade, DIP com ou sem sintomas e eventos intermediários (WIESENFELD et al., 2005). A infecção subclínica das tubas uterinas pela CT e consequente inflamação pode levar a infertilidade e outras complicações em um número significativo de mulheres. No entanto, não existem estudos publicados que avaliem diretamente esta forma prospectiva e a extensão à qual isto ocorre permanece pouco esclarecida (GOTTLIEB et al., 2010).

A principal doença causada por CT é o tracoma, que afeta a parte superior interna da pálpebra e da córnea e é uma das causas mais comuns de cegueira infecciosa. A doença começa como uma infecção inflamatória da pálpebra e evolui para triquíase tracomatosa e cegueira devido à opacidade da córnea. Em países em desenvolvimento, mais de 90% da população está infectada. Embora esforços para controle da infecção ocorram, estima-se que mais de 500 milhões de pessoas ainda está exposta à infecção em maior risco (WHO, 2005).

Mais de 140 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de seis milhões de pessoas sofrem de cegueira causada pela clamídia na África,

Oriente Médio, América Central e do Sul da Ásia, e nos países da América Latina. A doença é particularmente prevalente e grave em populações rurais que vivem em áreas pobres e áridas onde as pessoas têm acesso limitado ao saneamento básico (WHO, 2005).

3.2.1 Prevalência da Infecção por *Chlamydia trachomatis*

A infecção genital por clamídia ocorre principalmente em populações jovens e está fortemente associada ao comportamento sexual de risco (WILSON et al., 2002). As taxas de infecções genitais causadas pela clamídia estão aumentando, mas ainda não está claro se esse aumento é devido à ampliação da disponibilidade de testes de diagnóstico ou se a incidência realmente aumentou (LOW, 2008).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), ocorrem mais de 340 milhões de casos de DSTs curáveis anualmente em todo o mundo, e as consequências da infecção por clamídia em mulheres, como facilidade de transmissão do HIV, infecções oculares em recém-nascidos, infecção disseminada e infertilidade são graves e profundas (SU et al., 2011).

Nos últimos anos, grandes estudos de prevalência foram realizados em vários países e continentes. Em um estudo realizado com 40.000 mulheres, na faixa etária de 15-26 anos inscritas em um programa de eficácia da vacina contra o HPV, realizado em 14 países de quatro continentes, foi encontrada uma prevalência de 4% para infecção por clamídia. (PAAVONEN, 2008 e 2009). Na população em geral, a prevalência da infecção pela bactéria varia de 1,0-12% (CHRISTIAN et al., 2005; LAN et al., 2008), e pode chegar a 35% em populações vulneráveis, como profissionais do sexo (DIALLO et al., 1998), pessoas com baixo nível socioeconômico (WHO, 2005), população jovem, população negra (MONTEIRO et al., 2005), pessoas com exposição sexual frequente (RYAN et al., 1998), e ainda pessoas com sintomas específicos (corrimento cervical mucopurulento e dor no abdomen inferior) (RYAN et al., 1998; CHRISTIAN et al., 2005).

Além da idade, outros fatores de risco são observados, como histórico de infecção por clamídia ou outras DSTs, uso de contraceptivos orais, promiscuidade sexual e uso inconsistente de preservativos. Desta forma, a prevalência da infecção por clamídia varia dependendo da população testada e do programa de rastreio. De acordo com um estudo desenvolvido na Europa, aos 15 anos, 25% das

adolescentes que vivem em regiões urbanas já adquiriram sua primeira DST e, na maioria das vezes, o agente causal é CT (TU et al., 2009). Nos Estados Unidos, mais de 2,8 milhões de novos casos de infecção pela clamídia ocorrem anualmente (ARAL et al., 2007; CDC, 2009).

A infecção por CT é de notificação compulsória nos Estados Unidos. Desde 1994, tem constituído a maior proporção de todas as DSTs notificadas ao CDC. Pesquisas nacionais realizadas entre 1999 e 2008 revelaram uma prevalência de 6,8% da infecção por clamídia em mulheres sexualmente ativas com idade entre 14 e 19 anos. Além disso, mulheres grávidas infectadas por clamídia podem passar a infecção para seus bebês durante o parto, podendo resultar em oftalmia neonatal e pneumonia. Devido à alta carga de doenças de risco associadas com a infecção, o CDC recomenda que todas as mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 26 anos sejam rastreadas anualmente (CDC 2011).

O CDC e a *American Social Health Association* (ASHA-EUA) preconizam o rastreamento de rotina para CT em gestantes e em todas as mulheres sexualmente ativas entre 15 e 25 anos de idade (CDC, 2006). Ainda poucos países realizam rotineiramente o rastreamento (*screening*) para infecção por CT. A Suíça em 1982 foi o primeiro país a colocar em prática os programas de rastreamento (LOW, 2007). Outros países, como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Escócia passaram a adotar programas de rastreamento, cujos resultados foram bastante satisfatórios, com redução da taxa de doença inflamatória pélvica (AHRQ, 2007; NCSSG, 2006) e, conseqüentemente, enorme economia de recursos para a saúde pública (v, 2006).

Na Inglaterra, o Programa Nacional de Triagem para clamídia oferece rastreio para todas as pessoas sexualmente ativas com idade inferior a 25 anos. Ao total, foram rastreadas 334.902 pessoas entre 2007 e 2008. A prevalência foi de 9,3% em mulheres e 7,6% em homens (SIMMS et al, 2009; PAAVONEN,2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) preconiza a abordagem sindrômica para o diagnóstico e tratamento das endocervicites, isto é, a definição da conduta é baseada na presença de fatores de risco para infecção por clamídia e em manifestações clínicas inespecíficas (BRASIL, 2005). O grande questionamento da efetividade da abordagem sindrômica está relacionado ao grande número de mulheres com infecção assintomática (SILVA et al., 2009).

Não existe um programa brasileiro de rastreamento para Clamídia. No ano de 2001, ocorreram cerca de dois milhões de casos de acordo com o MS (BRASIL, 2006). Mesmo que não se tenha um

programa formal de rastreio no Brasil, o Sistema Único de Saúde - SUS, passou a colocar em sua tabela de procedimentos os testes de biologia molecular (Captura híbrida) para o diagnóstico de CT (DOU, 2007).

3.2.2 Diagnóstico Laboratorial da infecção por CT

O diagnóstico clínico da infecção por CT ainda é um desafio, pois a maioria das infecções é assintomática e mesmo os casos sintomáticos podem não ser identificados devido à semelhança dos sintomas com outras DSTs, por isso, o diagnóstico laboratorial deve ser considerado, especialmente nos programas de rastreio (HOCKING et al., 2013)

A clamídia pode ser diagnosticada pela detecção de inclusões intracitoplasmáticas em cultura de células, teste imunoenzimático, imunofluorescência direta (IFD), técnicas de hibridização e amplificação de ácidos nucleicos (NAATS) (CDC, 2010).

Os testes de detecção de ácidos nucleicos têm adquirido importância por apresentarem sensibilidade e especificidade suficientes para serem utilizados em amostras não invasivas como a urina ou amostras coletadas com *swabs* vaginais e uretrais pelo próprio paciente, especialmente quando se pensa no diagnóstico de pessoas assintomáticas e na adesão do paciente ao diagnóstico (GAYDOS et al., 2006). Em um estudo, que avaliou a adesão ao kit de autocoleta com *swabs* vaginais (mulheres) e uretrais (homens), a maioria das mulheres (75,7%) preferiu a opção de fazer a autocoleta da amostra em sua casa do que ir até uma clínica (16,1%) ou consultar seu próprio médico (8,2%) (GRASECK et al., 2010). Os pesquisadores observaram que a opção da autocoleta em casa foi associada a um aumento significativo na adesão aos programas de triagem e retestagem daquelas mulheres positivas (JENKINS et al., 2012).

3.2.2.1 Cultura Celular

O cultivo celular da clamídia é considerado por alguns autores o método padrão-ouro para o diagnóstico da infecção clamidiana, devido a sua especificidade em torno de 100% (BLACK 1999), e sensibilidade variando entre 65% a 85% quando comparada aos NAATs (ANDREWS et al., 1997; FARINA et al., 2002; DUARTE, 2004; ZAMITH et al.,

2005). A cultura também permite a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (MANAVI, 2006). Embora esse método seja muito específico, o seu custo extremamente elevado, a necessidade de utilização de técnicas sofisticadas, como meios de cultura em células vivas, a possibilidade de contaminação e perda da cultura, além do tempo de cultivo, inviabilizam sua utilização na prática clínica (FRIAS et al., 2001; OLIVEIRA, 2007).

O método consiste na inoculação de amostras clínicas em células susceptíveis a *C. trachomatis*. As células infectadas após 48-72 horas desenvolvem inclusões intracitoplasmáticas, as quais abrigam grande número de corpos elementares e reticulares. Esses são incubados com anticorpos monoclonais que se ligam à MOMP da *C. trachomatis* e posteriormente são detectados por imunofluorescência direta. As desvantagens da cultura celular incluem baixa sensibilidade, além de a técnica exigir experiência dos profissionais executores (MANAVI, 2006).

3.2.2.2 Métodos para Detecção de Antígeno

As técnicas de detecção de antígenos são rápidas e de baixo custo. Estão disponíveis no mercado duas metodologias diferentes: a imunofluorescência direta e os métodos imunoenzimáticos. Entretanto, devem ser utilizados com cautela em populações com baixa prevalência pela possibilidade em se obter resultados falso-positivos em 2 a 3% das amostras (FARINA et al., 2002; DUARTE, 2004a; ZAMITH et al., 2005).

3.2.2.2.1 Imunofluorescência Direta (IF)

A técnica de imunofluorescência direta utiliza anticorpos monoclonais contra a principal proteína de membrana da clamídia, a MOMP. O teste envolve um esfregaço de secreção vaginal fixado com metanol. Anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína são adicionados à lâmina. Após incubação, os corpos elementares clamidianos são visualizados em microscópio de fluorescência em aumento de 100X (MAHONEY; CHERNESKY, 2003). Apresenta sensibilidade de 80- 90% e especificidade de 98-99%, quando comparado à cultura de células (FARINA et al., 2002; DUARTE, 2004a; ZAMITH et al., 2005).

A desvantagem do método é a necessidade de um microscopista treinado e experiente à execução da leitura e a dificuldade de processamento de uma grande quantidade de amostra (ZAMITH et al., 2005).

3.2.2.2.2 Métodos Imunoenzimáticos (ELISA – *Enzyme linked immunossorbent assay*)

Dentre os métodos imunoenzimáticos disponíveis no mercado, o teste de ELISA é o mais utilizado. Este método emprega anticorpos monoclonais ou policlonais para detecção do antígeno lipopolissacarídeo (LPS) da clamídia, sendo esta a maior desvantagem deste método, e a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com o LPS de outras bactérias. Alguns fabricantes utilizam anticorpo bloqueador para retestar amostras positivas, melhorando, desta forma, a sua especificidade (99,5%) do teste (ZAMITH et al., 2005).

3.2.2.3 Métodos Moleculares

O diagnóstico da infecção genital por clamídia evoluiu rapidamente a partir da década de 1990. Os avanços mais importantes foram obtidos com a introdução dos testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs). Com o advento dos NAATs para a testagem de clamídia, agora se tem acesso a testes mais sensíveis que em geral permitem a utilização de amostras coletadas pelos próprios pacientes e de sítios anatômicos mais distantes do local de origem da infecção (por exemplo, urina, para uma infecção cervical) (HOCKING et al., 2013).

Os testes NAATs não dependem da viabilidade da amostra, (GOLDENBERG et al., 2008; HOCKING et al., 2013) e possuem alto desempenho (sensibilidade maior que 90% e especificidade superior a 99%). As desvantagens estão relacionadas com a necessidade de uma estrutura laboratorial elaborada e o seu desempenho reduzido na presença de inibidores, principalmente em amostras urinárias (estrógeno, nitratos e cristais) (MANAVI, 2006).

Para o diagnóstico de clamídia, os testes moleculares são baseados em diferentes tecnologias e incluem PCR, Reação em Cadeia da Ligase (LCR) amplificação por deslocamento de cadeia (SDA), amplificação baseada na sequência de amplificação mediada por

transcrição (TMA), detecção de RNAr e PCR em tempo Real (MANAVI, 2006).

Eles têm como alvo sequências gênicas da MOMP, do plasmídeo críptico ou do RNAr da CT. Os testes que utilizam genes com inúmeras cópias apresentam sensibilidade superior, como é o caso do RNAr e do plasmídeo críptico de CT, o qual está presente na ordem de sete a 10 cópias por corpo elementar (MANAVI, 2006).

O LCxProbe (Abbott Laboratories) é um tipo de NAAT disponível comercialmente, baseado na LCR, que tem como alvo uma sequência do plasmídeo críptico da CT. O método consiste em quatro etapas: hibridização de sondas com a sequência alvo; reparo dos *gaps* com a DNA polimerase e a DNA ligase; amplificação da sequência alvo por meio de reações sucessivas com a polimerase e ligase; e detecção dos amplicons de LCR utilizando sistema de captura com *beads* marcadas com substâncias fluorescentes (GAYDOS et al., 2004).

O AC2 (Gen-Probe) é outro tipo de NAAT disponível comercialmente, baseado na Amplificação Mediada pela Transcrição (TMA), o qual permite a detecção de ambos *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* e para CT tem como alvo o RNAr. O método consiste em três etapas que ocorrem no mesmo tubo: isolamento da sequência alvo utilizando a tecnologia de captura do alvo, amplificação da sequência alvo utilizando TMA, e detecção do sinal emitido pela sonda hibridada utilizando um método duplo cinético, o qual permite a diferenciação do sinal a partir de cada agente patogênico (GAYDOS et al., 2004).

3.2.2.4.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é a técnica mais conhecida das tecnologias de amplificação de DNA e pode ser dirigida a diferentes alvos, como o gênero ou espécie de clamídia dependendo do *primer* escolhido. Quando o objetivo é a identificação do gene da CT, tem-se como alvo o gene da maior proteína de membrana da CT (MOMP), o gene do plasmídeo críptico, o gene da fosfolipase (LPS) e o gene rRNA 16S e 23S (MALHOTRA et al., 2013).

A amplificação do DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma sequência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica. A PCR detecta com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em

amostras clínicas. São capazes de detectar até uma única partícula plasmídica de CT (XIA et al., 2007).

O teste PCR Amplicor (Roche) utiliza os *primers* biotinilados CP24 e CP27 que flanqueiam uma sequência de 207 pb do plasmídeo críptico da CT. O ensaio utiliza desoxi-uracila no lugar de desoxi-timina, assim a ação da enzima uracil-N-glicosilase promove a eliminação de DNAs contaminantes que tenham uracila, substituindo timina antes da amplificação. Como controle interno da reação e da presença de inibidores, é amplificada uma sequência aleatória de DNA e uma fita de DNA recombinante com sítios de ligação homólogos aos *primers* do plasmídeo da CT. O teste está validado para amostras cervicais, uretrais masculinas e urinárias para ambos os sexos. A sensibilidade e especificidade são de 90% a 99-100%, respectivamente para todas as amostras (LIVENGOOD; WRENN, 2001).

O teste de PCR para a detecção de CT desenvolvido pela Roche Diagnostics (Roche Amplicor) foi o primeiro teste de PCR aprovado pelo FDA nos Estados Unidos. Desde 1993, o Amplicor PCR foi bem avaliado para ambas as amostras de urina e urogenital, com sensibilidade e especificidade de 90% e 99-100%, respectivamente. O Amplicor PCR foi aprovado para amostras cervicais, uretrais e urinárias (MALHOTRA et al., 2013).

A sensibilidade dos testes de amplificação do DNA é cerca de 20% maior do que as demais técnicas de cultura, imunofluorescência direta e enzimoimunoensaio. Os NAATs são, portanto, considerados um importante avanço na detecção de CT e são atualmente utilizados na rotina para o rastreamento e diagnóstico da CT, sendo o método de escolha para o diagnóstico dessa infecção, independente da situação clínica (BARBEYRAC, 2013). A escolha do teste é essencialmente dependente do custo e de preferência do laboratório (GAYDOS et al., 2004).

3.2.2.4.2 Captura Híbrida

A Captura Híbrida (Digene) é uma técnica baseada em sondas de RNA e amplificação do sinal de detecção. A sonda de RNA é complementar à sequência completa do plasmídeo críptico da CT (7.500 pb). O híbrido DNA-RNA formado pela ligação da sonda com a sequência do plasmídeo da CT é capturado por anticorpos específicos

conjugados com a enzima fosfatase alcalina e a geração do sinal ocorre pela clivagem de um substrato quimioluminescente pela enzima. A amplificação máxima do sinal é atingida porque várias moléculas de fosfatase alcalina são conjugadas a cada anticorpo e estes se ligam em grande número ao híbrido DNA-RNA. O limite de detecção varia de 50 a 2500 EBs para os 15 sorotipos da CT (GIRDNER et al., 1999).

O teste é comercialmente apresentado em três formatos: HC II CT/NG, é um teste de triagem que não diferencia a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Chlamydia trachomatis*, HC CT-ID, é um teste específico para CT e o HC GN-ID, é um teste específico para a *Neisseria gonorrhoeae*. A segunda geração do teste de captura híbrida, que emprega um sistema semi-automatizado também está disponível no mercado, entretanto somente a geração manual tem aprovação do FDA (VAN DER POL et al., 2002).

A sensibilidade do teste de captura híbrida para a CT varia de 95,4 a 97,2% em relação à cultura e a PCR (Amplicor CT-PCR, Roche) e a especificidade é superior a 99,0% em amostras cervicais. Esse método dispensa a separação de áreas de trabalho e a partir de uma única coleta (*swab*) é possível pesquisar CT, HPV e *Neisseria gonorrhoeae* (VAN DER POL et al., 2002).

3.3 MECANISMOS DE INFECTIVIDADE DE *Chlamydia trachomatis* ASSOCIADA AO HPV E AO CÂNCER

A capacidade que *Chlamydia* spp. tem em induzir a fagocitose em células epiteliais favorece sua atuação sem que os mecanismos de defesa sejam prontamente ativados. Essa forma lenta e progressiva de infectar a célula confere à infecção por clamídia um caráter silencioso e insidioso na grande maioria dos casos (GIRALDO, 2000).

Durante a infecção, a resposta imune humoral e a celular podem efetuar mecanismos de defesa inadequados, o que favorece a evolução da infecção sem que, necessariamente a CT ainda esteja presente, ou seja, o processo inflamatório local permanece ativo mesmo se a infecção por CT já estiver curada. Essas bactérias produzem proteínas denominadas de proteína do choque térmico 60 clamídiano (do inglês, *chlamydial heat shock protein 60* – CHSP60) que se assemelham muito com as HSP60 humanas produzidas por hospedeiros infectados e em situações de estresse (GIRALDO, 2000).

As CHSP60 possuem mais de 50% de similaridade com as humanas na sequência de aminoácidos que determina seu epítipo de

antigenicidade. Como essas proteínas são altamente antigênicas, desencadeiam uma resposta imune adquirida contra a CT que se perpetua mesmo quando já não existe a presença da bactéria e que pode manifestar-se sob uma situação de estresse, na qual a mulher pode produzir suas próprias HSP60 (GIRALDO, 2000).

Nos últimos anos, estudiosos também avaliaram a presença da expressão de HSP10 em diversos modelos de carcinomas humanos e observaram um acúmulo no espaço intracitoplasmático dessas moléculas bem como o aumento gradual da sua expressão à medida que aumentava o grau de displasia celular. Assim, a hipótese é que devido à superexpressão das HSP60 e HSP10 em lesões pré-neoplásicas, poderia-se postular que essas moléculas têm um papel diferente (não de chaperona) durante a carcinogênese cervical (CAPELLO et al., 2002-2003).

Pesquisadores demonstram que HSP60 humanas podem ter um papel na ativação da apoptose por meio da ativação da cascata das caspases. A associação entre as chaperonas HSP60 e HSP10 forma um complexo (HSP60/HSP10) capaz de se ligar à pró-caspase-3 dentro da mitocôndria, promovendo em seguida a liberação da HSP60 deste complexo no citoplasma da célula. A presença da HSP60 no citoplasma regula positivamente a apoptose (através da ativação da caspase), funcionando, neste caso, como um agente pró-apoptótico. Foi observado também, no mesmo estudo, a indução da caspase-3 pela superexpressão de HSP-60 e HSP-10 recombinante (SAMALI et. al, 1999; JHA et. al, 2011).

Entretanto, outros estudos demonstram que as HSP60 podem também ter um efeito anti-apoptótico devido a sua habilidade em formar complexos com a Bax e Bak no citoplasma de células normais, bloqueando a capacidade de induzir apoptose *in vitro*. Os mesmos autores observaram que quando células musculares são submetidas à hipóxia, as HSP60 citosólicas alocam-se na membrana plasmática dessas células e estimulam a Bax a se ligar à mitocôndria. A ligação da Bax na mitocôndria favorece a liberação do citocromo *c* no citoplasma e induz a formação do apoptossoma, um complexo multimérico formado pelo fator ativador da apoptose (Afa-1) e pela pró-caspase 9. A pró-caspase-9 é considerada a proteína iniciadora da via intrínseca da apoptose (GUPTA; KNOWLTON, 2002; KIRCHHOFF, GUPTA e KNOWLTON, 2002; ALLAN; CLARKE, 2009).

Durante a infecção persistente por clamídia, corpos elementares aberrantes produzem grandes quantidades de CHSP60. O acúmulo dessas proteínas dentro e fora da célula infectada promove a ativação da resposta imune específica do hospedeiro mediada por células B e T, envolvendo receptores denominados de *Toll Like* (TLRs) (STEPHENS, 2003). Os TLRs são proteínas transmembrana de células eucarióticas com domínios extracelulares capazes de reconhecer lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos e lipoproteínas de bactérias. Entretanto, já existem estudos (SASUS et. al, 2001) que demonstram que a endocitose das CHSP60 na célula hospedeira é mediada pelos TLRs (AKIRA et. al, 2001).

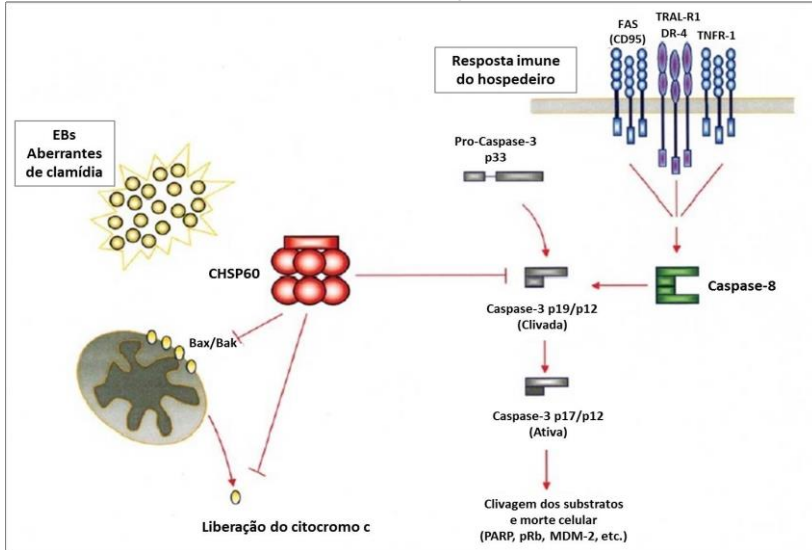
As CHSP60 podem promover a secreção do fator de necrose tumoral (TNF- α) pelos macrófagos (KOL et. al, 1998), e também podem estimular células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos a produzir fatores de adesão e citocinas pró-inflamatórias (IL-11, IL-8, IL-12, IL-6), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) por meio da ativação do fator nuclear (NF-KB). Por outro lado, as CHSP60 podem ter um efeito anti-apoptótico, pois possuem a capacidade de formar complexos com a caspase-3 clivada e com as proteínas da família Bax e Bak, bloqueando a via de apoptose, tanto pela via da cascata das caspases quanto pela via citocromo *c* (Figura 6) (FELICE et al., 2005).

Wallin e colaboradores (2002) desenvolveram um estudo de rastreamento na Suécia para avaliar a correlação entre a infecção por CT e o desenvolvimento do câncer cervical. Foram identificados 118 casos que posteriormente desenvolveram carcinoma cervical invasivo e dentre esses 10 (8%) apresentaram DNA de clamídia. Dentre os controles, nenhum foi positivo para CT. A maioria dos pacientes desenvolveu câncer no período de 3 a 6 anos após a infecção por clamídia. Contudo a presença concomitante do DNA do HPV era fator necessário para o desenvolvimento do câncer.

No homem, o controle da proliferação celular ocorre por dois mecanismos, a apoptose e a senescência celular. A senescência celular é considerada um mecanismo importante ao bloquear de forma irreversível a replicação de células anormais, enquanto que a apoptose mata e elimina células neoplásicas. A presença de mutações ou proteínas oncogênicas juntamente com a produção de CHSP60-1 pode cooperar para a inibição da senescência celular e apoptose causando a proliferação de células anormais e causando dano tecidual. Portanto, a infecção por *Chlamydia* spp. pode bloquear tanto a apoptose quanto a

senescência celular podendo levar ao câncer quando células são infectadas simultaneamente por oncovírus ou são danificadas por agentes carcinogênicos (FELICE et al., 2005).

Figura 6: Mecanismo da CT na carcinogênese cervical.



Durante a infecção persistente pela CT, as HSP60 podem interferir na apoptose induzida pela resposta inflamatória do hospedeiro. Durante a infecção persistente, corpos elementares aberrantes (EBs) produzem grandes quantidades de CHSP60, que podem estar fora da célula ou no citoplasma da mesma. A presença da CT induz uma grande resposta imune mediada por células B e T. A apoptose induzida por linfócitos ativados é iniciada pela estimulação dos receptores FAS, TNFR-1 ou TRAIL-R1. Seus ligantes estão na forma de trímeros e quando eles se ligam, eles induzem a trimerização dos próprios receptores. Estes interagem com a Caspase-8, promovendo a ativação da cascata das caspases, clivagens dos substratos, levando à morte celular. Para evadir-se do sistema imune, as CHSP60 citoplasmáticas podem interagir com a Caspase-3, impedindo a ativação da cascata das caspases. Além disso, as CHSP60 podem se ligar a Bax ou Bak, promovendo a inibição da liberação do citocromo *c* pela mitocôndria. Adaptado de FELICE et al., 2005.

4 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HPV constitui a DTS mais prevalentes em todo o mundo. Mais de 80% das mulheres no mundo, com idade por volta dos 50 anos estiveram infectadas pelo HPV ao longo do tempo, embora a maioria delas seja capaz de eliminar o vírus espontaneamente vida (CHATTERJEE et al., 2011).

Devido à má qualidade dos programas de rastreamento e acompanhamento do câncer do colo do útero, mais de 80% de todos os novos casos de câncer do colo do útero e mais de 85% de todas as mortes causadas por esta patologia estão em países em desenvolvimento (ANORLU, 2008).

Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países no mundo a introduzir a citologia de Papanicolaou para a detecção precoce do câncer de colo uterino, esta doença continua a ser um sério problema de saúde pública (BRASIL, 2013b). Neste contexto, os métodos moleculares são técnicas que podem contribuir para detecção precoce do HPV (CUBIE; CUSCHIERI, 2013). Os exames citológicos e histológicos tradicionais têm limitações quanto à distinção do pequeno número de mulheres com exames alterados, que poderão progredir para câncer invasivo da maioria daquelas cujas alterações irão regredir espontaneamente (WOODMAN, 2007). Assim se reforça a ideia de que é preciso usar testes complementares para a detecção de infecção pelo HPV.

A PCR, utilizando os iniciadores PGMY09/11 é um método sensível e promissor para estudar a infecção pelo HPV (GRAVITT et al., 2000). O RFLP é uma técnica que complementa a falta de especificidade da PCR em relação ao tipo viral (BERNARD et al. 1994; PAESI et al., 2009) e a detecção de múltiplas contaminações (IFTNER, VILLA, 2003; PAESI et al., 2009).

Na população brasileira, o HPV 16 oncogênico é o tipo mais freqüente em todas as regiões, sendo seguido pelo HPV 18 nas regiões Norte, Sul e Sudeste (FREITAS et al., 2007). No entanto, o estado de Santa Catarina ainda dispõe de poucos estudos de prevalência do vírus e a identificação dos tipos de HPV, principalmente os oncogênicos, os quais ainda serão importantes para o desenvolvimento de estratégia terapêutica.

Poucas evidências indicam que os tratamentos disponíveis no momento erradiquem ou afetem a história natural das infecções pelos

papilomavírus e que nenhum dos tratamentos seja superior aos outros, desta forma a, cada caso deverá ser avaliado separadamente decidindo-se a conduta mais adequada (BASEMAN, KOUTSKY, 2005).

A infecção e as complicações associadas à CT, como gravidez ectópica, conjuntivite, pneumonia e prematuridade em recém-nascidos, infertilidade, aumento do risco para histerectomia e DIP em mulheres, têm sido reconhecidas como um dos maiores problemas de saúde pública (PAAVONEN, 2012). Ocorrem cerca de 50 milhões de casos novos no mundo por ano. No Brasil não existem estudos robustos documentando a situação global da infecção pela CT. Estão disponíveis apenas estudos isolados em populações específicas, mas que mostram a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio (CODES et al., 2002; RAMOS et al., 2003; SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2003).

A maior prevalência de clamídia é observada entre adolescentes do sexo feminino (24,1% -27%) e sua associação com a idade juvenil destaca o papel importante que a triagem de mulheres sexualmente ativas desempenha na prevenção da infertilidade (WHO, 2011c).

Nos serviços públicos brasileiros, são raros os locais que oferecem sistematicamente a pesquisa da clamídia. Nos serviços privados, normalmente só se pesquisa essa infecção em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais está acometido. Mesmo nessas situações, a pesquisa da CT ainda não faz parte da rotina da maioria dos exames solicitados pelos ginecologistas, urologistas ou médicos que atendem DST, apesar da sua importância e sua possível relação com o câncer de colo uterino (CODES et al., 2006).

A cultura celular é considerada por muitos autores o “padrão-ouro” para o diagnóstico da CT, entretanto, a rápida evolução dos testes de amplificação do DNA (PCR, por exemplo) já suscita a reavaliação desse padrão na comunidade científica. A PCR detecta com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas e se mostra promissora no rastreamento da infecção por CT em diversos estudos (XIA et al., 2007).

O estado de Santa Catarina ainda dispõe de poucos estudos de prevalência do HPV e da CT e, portanto, o presente estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias de rastreamento e prevenção das infecções causadas por esses microrganismos.

5 METODOLOGIA

5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, descritivo, por amostragem aleatória na coleta de dados. As amostras foram coletadas no momento da realização do exame preventivo do colo uterino - Papanicolaou, no período de novembro de 2011 a março de 2013.

5.2 COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina sob nº de aprovação 2155 (processo nº 2155).

5.3 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Do total de mulheres atendidas no SUS entre novembro de 2011 a março de 2013, 325 mulheres sexualmente ativas e que procuraram o serviço de saúde para rastreamento rotineiro do câncer do colo do útero aceitaram participar da pesquisa. Todas foram atendidas pelo SUS no município de São Miguel do Oeste/SC.

As amostras foram coletadas durante a rotina do exame ginecológico. Pacientes que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídas no estudo e tiveram o material cervical coletado para os testes moleculares e análise citopatológica convencional.

As análises citopatológicas foram realizadas pela metodologia de citologia convencional no laboratório de citopatologia conveniado com a Secretaria Municipal de Saúde. As amostras para detecção da infecção pelo HPV e pela CT foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMM) e analisadas pelas técnicas de PCR-multiplex e PCR-RFLP. O Sequenciamento foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas Gerais e a técnica de *microarray* foi realizada no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (USP). Os testes moleculares foram realizados sem o conhecimento prévio dos resultados da citopatologia.

5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

A coleta do material cervical foi realizada utilizando-se o kit de citologia em base líquida SurePath™, comercializado pela empresa BD. Esta metodologia utiliza um dispositivo único para coleta das células endocervicais e ectocervicais e após a coleta, a ponta da escova é destacada e mantida dentro do frasco com o meio líquido conservante. As amostras foram armazenadas e conservadas até cinco semanas (máximo) a 4°C e enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias – LBMM do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Tiago da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC para o processamento e estudo molecular do material.

5.5 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o método *in house* baseado no Acetato de Amônio (RIVERO et al.; 2006). De cada amostra conservada na solução SurePath™ foi retirado 1 mL e transferido para um tubo de 1,5mL que foi centrifugado durante 5 minutos a 12000 x g . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 180µL de PBS estéril. Foram adicionados 20µL de Proteinase K (Qiagen- USA) e 180µL do *Buffer* AL (Qiagen- USA). A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 56°C sob agitação (1200 rpm) por uma hora. Em seguida o lisado celular foi incubado por mais uma hora a 90°C. Após a incubação, foram adicionados 200µL de acetato de amônio 2M, homogeneizado em vórtex e incubado em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi colocado em outro tubo de 1,5ml. A esse tubo, foram adicionados 600µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão 20 vezes e novamente foi centrifugada a 12000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1ml de etanol 70% ao *pellet* de DNA. Novamente as amostras foram homogeneizadas por inversão 20X e centrifugadas a 12000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi mantido à temperatura de 60°C até a total evaporação do etanol. Posteriormente o *pellet* foi suspenso em 50µL de Tris-EDTA (TE) e armazenado a -20°C até a sua utilização. O restante das amostras conservadas na solução SurePath™ foi armazenado a -80°C para novas extrações.

5.6 PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DO DNA DO HPV E CT

A PCR multiplex foi realizada com os iniciadores PGMY0911 para a detecção do DNA do HPV (GRAVITT et. al, 2000), CTP1/CTP2 para a detecção do DNA da CT (GRIFFAIS E THIBON, 1989) e como controle interno, foram utilizados os iniciadores PCO3/PCO4 (SAIKI et al., 1988) para detecção do gene da beta-globina humana. Os iniciadores PGMY09/11 amplificam um segmento de 450pb do gene L1 do HPV. Os iniciadores CTP1 e CTP2 amplificam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico de CT (GRIFFAIS; THIBON, 1989). Os iniciadores PCO3 e PCO4 amplificam um segmento de 110pb do gene da beta-globina humana e foram utilizados como controle em relação à presença de inibidores na reação de PCR (SAIKI et al., 1988). A sequência dos iniciadores está descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Relação dos iniciadores empregados para amplificação do DNA de HPV, *Chlamídia trachomatis* e no controle interno das reações de PCR.

Alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequências
HPV	PGMY11-A	5'- GCACAGGGACATAACAATGG - 3'
	PGMY11-B	5'- GCGCAGGGCCACAATAATGG - 3'
	PGMY11-C	5'- GCACAGGGACATAATAATGG - 3'
	PGMY11-D	5'- GCCCAGGGCCACAACAATGG - 3'
	PGMY11-E	5'- GCTCAGGGTTTAAACAATGG - 3'
	PGMY09-F	5'-CGTCCCAAAGGAAACTGATC - 3'
	PGMY09-G	5'- CGACCTAAAGGAAACTGATC - 3'
	PGMY09-H	5'- CGTCCAAAAGGAAACTGATC - 3'
	PGMY09- I	5'- GCCAAGGGGAAACTGATC - 3'
	PGMY09-J	5'- CGTCCCAAAGGATACTGATC - 3'
	PGMY09-K	5'- CGTCCAAGGGGATACTGATC - 3'
	PGMY09-L	5'- CGACCTAAAGGGGAATTGATC - 3'
	PGMY09-M	5'- CGACCTAGTGGAAATTGATC - 3'
	PGMY09-N	5'- CGACCAAGGGGATATTGATC - 3'
	PGMY09-P	5'- GCCCAACGGAAACTGATC - 3'
	PGMY09-Q	5'- CGACCCAAGGGGAAACTGGTC - 3'
	PGMY09-R	5'- CGTCCTAAAGGAAACTGGTC - 3'
	HMB01	5'- GCGACCCAATGCAAATTGGT - 3'
	CT	CTP1
CTP2		5'-TTCCCTGTGAATTCGTTGC- 3'
Beta-globina	PCO3	5'-ACACAACGTGTCTACTAGC - 3'
	PCO4	5'-CAACTTCATCCACGTTACC - 3'

A reação de multiplex foi realizada em um volume final de 25 μL contendo 12,5 μL QIAGEN[®] *Multiplex Master Mix* (Quiagen, USA), 0,036 μM dos iniciadores PGMY09/11, 0,24 μM dos iniciadores PCO3/PCO4, 0,20 μM dos iniciadores CTP1/CTP2 e 5 μl de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycle Personal[®] (Eppendorf, Alemanha) e foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/15 minutos, seguido por 40 ciclos: 94°C/30 segundos (desnaturação), 58°C/1,5 minutos (pareamento), 72°C/1 minutos (extensão) e 60°C/30 minutos (extensão final). Os *amplicons* foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,5% (80V/40 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta no ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Invitrogen[™] Life Technologies).

5.7 PCR COM OS INICIADORES PGMY0911 PARA A GENOTIPAGEM DO HPV

As amostras com resultados positivos para DNA de HPV na PCR multiplex foram submetidas à PCR com os iniciadores PGMY09/11 para a amplificação de um segmento de 450pb da região L1 do HPV. Os produtos de PCR foram submetidos à técnica de Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) - (descrita no item 5.8) para genotipagem do HPV.

A reação foi realizada em um volume final de 25 μL contendo 2,0mM MgCl_2 , 0,01 mg/mL de Soro Albumina Bovina (BSA-Invitrogen[™] Life Technologies), 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Invitrogen[™] Life Technologies), 0,01 μM de cada iniciador; Tampão da Taq Platinum polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH8.4, 500mM KCl), 2U de Taq Platinum DNA polimerase recombinante (Invitrogen[™] Life Technologies) e 5 μL do DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycle Personal[®] (Eppendorf, Alemanha) e foram utilizadas as seguintes condições: 94°C/1min.(desnaturação), 55°C/1min. (pareamento), 72°C/1min. (extensão) em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 5min. Os *amplicons* foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (100V/20 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA) .

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA *ladder* 100pb Invitrogen™ Life Technologies).

5.8 POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

As amostras com resultados positivos para DNA de HPV na PCR com os iniciadores PGMY0911 foram submetidas à técnica de Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP).

A técnica foi realizada segundo a metodologia desenvolvida por Nobre e colaboradores em 2008. As enzimas utilizadas para as técnicas de RFLP foram *Pst*I (Invitrogen®), *Hae*III (Invitrogen™ Life Technologies), *Dde*I (Promega, USA) e *Rsa*I (Promega, USA). Uma alíquota de 10µL do produto da PCR com os iniciadores PMGY09/11 foi utilizada para cada digestão. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 20µL, contendo 0,5U de cada enzima de restrição com o correspondente tampão (1X) e incubada por 1 hora a 37°C. Fragmentos de DNA foram fracionados por eletroforese em gel gel de poliacrilamida 12% (80V/2 horas), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta no ImagenQuant LAS500 (GE- EUA) . O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA 50pb e 25pb (Ludwig, Brasil) O padrão de tamanho de DNA foi aplicado em duas caneltas no gel. A interpretação dos resultados das clivagens seguiu o descrito por Nobre e colaboradores (2008).

5.9 PCR COM OS INICIADORES CTP1/CTP2 PARA A DETECÇÃO DO DNA CT

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) CTP1/CTP2 (descritos no item 5.6 de materiais e métodos - PCR Multiplex para a detecção do DNA do HPV e CT).

A reação foi realizada em um volume final de 25µL contendo 1,5mM MgCl₂, 0,01mg/ml de Soro Albumina Bovina (BSA-Invitrogen™ Life Technologies), 0,2mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen™ Life Technologies), 1µM de cada iniciador; Tampão de Taq Platinum polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH8.4, 500mM KCl), 1U de Taq Platinum DNA polimerase recombinante

(Invitrogen™ Life Technologies) e 2,5 µL do DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycle Personal® (Eppendorf) e foram utilizadas as seguintes condições: 96°C/40segundos (desnaturação), 57°C/40segundos (pareamento), 72°C/40segundos (extensão) em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 5 minutos. Os *amplicons* foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (80V/40 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA) . O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA *ladder* 100pb Invitrogen™ Life Technologies).

5.10 CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS PARA HPV E CT

Amostras provenientes de pacientes foram submetidas à PCR com os iniciadores PGMY0911 e CTP1/CTP2 para detecção do DNA do HPV e da CT. Os produtos de PCR foram clonados com o plasmídeo Pgem – T Easy Vector System (Promega, USA) e posteriormente sequenciados para a confirmação do genótipo de CT ou de HPV. As condições da reação de PCR com os iniciadores PGMY09/11 foram iguais às descritas no item 4.6 de materiais e métodos.

5.10.1 Preparação de Células Competentes

Células de *Escherichia coli* Max Efficiency DH5α (Invitrogen™ Life Technologies) foram estriadas em placa de Petri contendo meio de cultura Luria Base -LB (Invitrogen™ Life Technologies) incubadas *overnight* (por cerca de 18horas) a 37°C. Da placa foram isoladas colônias que posteriormente foram colocadas em tubo cônico (15ml) contendo 5ml de caldo LB. As células foram novamente incubadas *overnight* a 37°C mantidas sob agitação a 130rpm. Foram inoculados 500µL dessa cultura crescida *overnight* em 100 ml caldo LB, em um *erlenmeyer* de 500ml e deixado crescer por 3 horas sob forte agitação (130rpm) a 37°C. Em seguida verificou-se a Densidade Óptica (DO) que deveria estar entre 0,4-0,5 (mid-log). Ao ser obtida a DO desejada o caldo foi transferido para dois tubos falcon de 50ml cada. Esses tubos foram centrifugados a 5000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em cerca de 1ml do sobrenadante. A ele foram adicionados 10ml de CaCl₂ 0,1M

(Sigma-Aldrich-EUA) gelado, suspendendo-se novamente o pellet. A suspensão foi mantida em banho de gelo por 20 minutos e depois centrifugada novamente a 5000g por 5 minutos a 4°C. Novamente o pellet foi suspenso em cerca de 1ml do sobrenadante e acrescentou-se 10ml de tampão de congelamento (CaCl₂ 0,1M /10% glicerol). A suspensão foi mantida em banho de gelo por, pelo menos, 30 minutos. Em seguida, prepararam-se alíquotas de 200µL em tubos eppendorf que foram imediatamente congeladas em banho de gelo com etanol. As células foram armazenadas a -80°C até sua utilização.

5.10.2 Ligação do produto de PCR ao P-GEM T-Easy – Formação do DNA Recombinante

Foi utilizado o plasmídeo P-GEM T-Easy (Promega, USA) e a enzima T4 DNA Ligase (Promega, USA) para a formação do DNA recombinante (ligação dos produtos de PCR do HPV (450pb) e da CT (201pb) ao plasmídeo). A reação foi realizada em um volume final de 10µL contendo 5µL de Tampão, 1µL do P-GEM T-Easy, 1 µL da enzima T4 DNA ligase e 3 µL de produto de PCR com os iniciadores PGMY0911 para o HPV ou 3 µL de produto de PCR com os iniciadores CTP1/CTP2 para a clamídia. A reação de ligação do inserto (produto de PCR) ao plasmídeo foi realizada em termociclador Mastercycle à 4°C *overnight*.

5.10.3 Transformação das Células Competentes

A inserção do DNA recombinante em células competentes foi realizada após o descongelamento das células em banho de gelo por 10 minutos. O tubo contendo 200µL de células foi adicionado 5µL do inserto de HPV e a outro tubo contendo a mesma quantidade de células competentes foram adicionados 5µL do inserto de clamídia. As células foram homogeneizadas suavemente sem pipetar. A mistura contendo as células e o inserto foi submetida a banho de gelo por 30 minutos, seguido por um choque térmico de 42°C por 45 segundos. A seguir a mistura foi submetida a banho de gelo por 2 minutos. Foram adicionados 400µL de meio SOC (Invitrogen™ Life Technologies) às células transformadas e homogenizadas sem pipetagem. As células foram incubadas a 37°C por 1hora sob agitação de 100rpm. Todo o volume foi semeado com alça de Drigalki em placa de Petry contendo

meio LB, ampicilina (100mg/ml), X-gal (20mg/ml) e IPT-G (200mg/ml). As placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

5.10.4 Seleção das colônias

A efetividade da transformação das bactérias pode ser verificada uma vez que as células foram semeadas em meio LB com ampicilina, X-gal e IPTG e incubadas a 37°C *overnight*, conforme descritos no item 4.8.3 de Materiais e Métodos.

Todo plasmídeo é composto por uma região promotora, um sítio de clonagem, uma origem de replicação e um gene que codifica a resistência a antibiótico. A origem de replicação é uma sequência específica do plasmídeo, com cerca de 1.000pb, na qual tem início a replicação do DNA, independente do DNA genômico, sendo necessária para a multiplicação das bactérias com o DNA recombinante. Quando o plasmídeo recebe o inserto, este se insere no local do gene promotor da transcrição da beta-galactosidase, portanto, bactérias que receberam o plasmídeo com o inserto, não expressam o gene da beta-galactosidase e consequentemente o substrato da enzima (X-gal) não será metabolizado pela enzima, por isso, as colônias das bactérias do nosso experimento, que abrigavam o plasmídeo com o inserto, ficaram brancas. As bactérias que receberam o plasmídeo sem o inserto expressaram o gene da beta-galactosidase, neste caso, o X-gal foi metabolizado e as colônias apresentaram coloração azul. Desta forma, o antibiótico foi utilizado para selecionar as bactérias que receberam o plasmídeo, pois o mesmo possui o gene de resistência ao antibiótico utilizado e, portanto, somente bactérias que receberam o plasmídeo cresceram. Já o X-gal e o IPTG foram utilizados para diferenciar bactérias que receberam o DNA recombinante (colônias brancas) das bactérias que não receberam o DNA recombinante (colônias azuis). Desta forma, as colônias brancas foram selecionadas para fazer o repique e posterior extração do DNA plasmidial.

5.10.5 Extração do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial, foi centrifugado 1ml da suspensão de bactérias em caldo LB suplementado com ampicilina em tubo de 1,5ml a 1750 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, o pellet foi suspenso em 200µL de água destilada estéril e em seguida,

submetido a banho quente de 99°C por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 7000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5ml e em seguida, foi adicionado 1µL de RNAase e deixados sob a bancada *overnight*.

5.10.6 PCR com os iniciadores CTP1/CTP2 para a amplificação do DNA plasmidial de CT

A reação de amplificação foi realizada segundo o protocolo descrito no item 5.9- PCR com os iniciadores CTP1/CTP2 para a detecção do DNA de CT de Materiais e Métodos com exceção da quantidade de DNA. Nesta PCR, foram utilizados 1µL do DNA plasmidial de clamídia.

5.10.7 PCR com os iniciadores PGMY09/11 para a amplificação do DNA plasmidial de HPV

A reação de amplificação foi realizada segundo o protocolo descrito no item 5.7- PCR com os iniciadores PGMY0911 para a Genotipagem do HPV de Materiais e Métodos com exceção da quantidade de DNA. Nesta PCR, foram utilizados 1µL do DNA plasmidial de HPV.

5.11 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento dos clones de HPV e CT, bem como dos *amplicons* de amostras clínicas positivas para HPV foram realizados no sequenciador ABI 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems - Life Technologies) utilizando-se o kit ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas Gerais. Para a reação de sequenciamento dos clones de HPV e das amostras clínicas positivas para este vírus utilizou-se os iniciadores PGMY0911. Para a reação de sequenciamento dos clones de CT utilizou-se os iniciadores CTP1/CTP2.

5.11.1 Purificação do DNA

A purificação do DNA de amostras clínicas foi realizada com o *PureLink[®] PCR Purification Kit* (Invitrogen -USA) ou o com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen- USA), conforme instruções dos fabricantes.

A purificação dos DNAs plasmidiais de HPV e CT foi realizada com o *PureLink[™] Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen -USA), conforme instruções dos fabricantes.

Os produtos purificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados pelo brometo de etídio (1µg/ml). Os *amplicons* foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (80V/40 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho molecular (DNA *ladder* 100pb Invitrogen[™] Life Technologies).

5.11.2 PCR, precipitação do DNA e sequenciamento

Para a reação de PCR, foram utilizados 2µL de tampão Tris-HCl, 1µL de BigDye Terminator v1.1/3.1 *Sequencing Buffer*, contendo dNTP, ddNTP, Taq DNA polimerase e MgCl₂ (Applied Biosystems – Life Technologies), 1µL do iniciador *forward* ou *reverse* (3,2 pmol), 5µL do produto purificado diluído (contendo 3-10ng de DNA) e 1µL de água purificada. A PCR foi feita em placa de 96 poços. As condições foram 96°C/2 segundos, seguidos por 35 ciclos de 96°C/10 segundos, 55°C/45 segundos e 72°C/60 segundos e extensão final de 72°C/60 segundos.

Após a retirada da placa do termociclador, foram adicionados 40µL de isopropanol 65%, a placa foi agitada no vortex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foi centrifugada por 45 minutos a 3700rpm. Descartou-se o sobrenadante, vertendo a placa. O *pellet* foi lavado com 250µL de etanol 60% e a placa foi centrifugada por 15 minutos a 3700rpm e colocada no termociclador por 1 minuto a 90°C para secar. O produto amplificado foi ressuspenso com 20µL de formamida, desnaturado por 5 minutos a 96°C, transferido imediatamente para um banho-maria de gelo e os produtos injetados no sequenciador.

5.11.3 Análise das Sequências

As sequências obtidas dos clones de HPV e CT, assim como as obtidas de amostras clínicas positivas para HPV foram analisadas no programa Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Austrália). As sequências obtidas foram alinhadas no software BLAST para verificar sua identidade.

5.12 MICROARRAY – KIT PAPIILOCHECK® (GREINER BIO-ONE)

Os DNAs de amostras positivas na PCR com os iniciadores PGMY0911 para detecção do DNA do HPV foram submetidos à técnica de *microarray* com o Kit comercial PapilloCheck® (Greiner Bio-one-Germany) no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

5.12.1 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 26µL, contendo 19,8µL de PapilloCheck® PCR MasterMix, 1U de Taq Hot Start (Qiagen- USA), 0,005 U de Uracil-N-Glycosylase (UDG) e 5µL de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycle Personal® (Eppendorf) sob as seguintes condições: 37°C/20 minutos, 96°C/15 minutos (desnaturação inicial), 96°C/15 minutos (desnaturação inicial), seguido por 40 ciclos de 95°C/30 segundos (desnaturação), 55°C/25 segundos (pareamento), 72°C/45 segundos (extensão); seguido por 15 ciclos de 95°C/30 segundos e 72°C/45 segundos.

5.12.2 Reação de Hibridização e leitura dos resultados

Para cada uma das amostras foram adicionados 5µL de produto de PCR a 30µL de tampão de hibridização (PapilloCheck®) em tubos de 0,2ml. Uma alíquota de 25µL dessa reação foi adicionada a cada chip que estava aderido a uma lamina de vidro. As amostras foram incubadas em câmara escura e úmida à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a hibridização, as lâminas contendo os chips foram lavadas com o tampão I por 10 segundos à temperatura ambiente. Uma segunda etapa

de lavagem foi realizada com tampão II por 1 minuto à temperatura de 50°C. A terceira lavagem foi realizada à temperatura ambiente com o tampão III por 10 segundos. Após a lavagem, as lâminas foram colocadas em tubos cônicos de 50ml e centrifugadas a 500 x g por 3 minutos. Imediatamente, as lâminas foram lidas no CheckScanner (Greiner Bio-one- Germany) e analisadas com o Software CheckReport (Greiner Bio-one- Germany).

5.12.3 Controle de Qualidade

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos pela metodologia de *microarray* (Papillocheck®) a reação dispõe de quatro controles: Controle de orientação e impressão (*Orientation control*), Controle de hibridização (*Hybridisation control*), Controle da PCR (*PCR control*) e Controle da amostra (*Sample control*).

Como controle de orientação e impressão (*Orientation control*) o chip gera sinais de fluorescência, independentes da eficiência do processo de hibridização. Esses pontos são utilizados pelo Software como pontos de indicação para o local correto de leitura. Além disso, a qualidade do processo de leitura é controlada pela presença de um sinal de fluorescência verde em cada poço do chip. Para controle de hibridização (*Hybridisation control*), a eficiência da reação de hibridização é monitorada com uma sonda marcada com fluorocromo e misturada ao tampão de hibridização. Essa sonda hibridiza sequências específicas de DNA no chip. Um resultado eficiente de hibridização se verifica quando os cinco poços emitem sinais de fluorescência. O controle da PCR (*PCR control*) monitora a qualidade da reação pela amplificação de um controle interno, cujo molde está presente no Papillocheck PCR *Master Mix*. A qualidade da reação de amplificação também é avaliada pelo CheckReport™*Software*. Se o desempenho da PCR for baixo, o Software indica que o controle da PCR falhou e, neste caso, a análise deve ser repetida. O Controle da amostra (*Sample control*) monitora a qualidade da amostra e ou/extração do DNA pela amplificação de um segmento do gene da Adenosina deaminase1 (ADAT1).

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre as variáveis nominais e os desfechos positividade para o HPV, CT e coinfeção HPV/CT foi realizada pelo teste qui-quadrado ou Exato de Fisher. Para verificar a correlação entre as variáveis nominais e os desfechos foi utilizada a Análise de Regressão Logística Binária. Para determinar a concordância entre os métodos de genotipagem do HPV (RFPL, sequenciamento e *microarray*) foi utilizado o teste Kappa e adotaram-se como referência os valores determinados por Altman (1991). Desta forma, foi atribuída concordância pobre para valores de Kappa entre 0,00-0,20, concordância razoável a valores entre 0,21 a 0,40, concordância moderada a valores entre 0,41-0,60, concordância boa a valores 0,61-0,80 e excelente concordância a valores entre 0,81-1,00.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da metodologia RFLP foram calculados pela Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) adotando-se como padrão áureo as metodologias de sequenciamento e *microarray*. Para os tipos virais que não foi possível cálculo pela Curva ROC, foi utilizado o Software Microsoft Excel versão 2010. A acurácia do teste RFLP foi medida sobre a área da curva ROC. Desta forma, a acurácia do teste diagnóstico foi interpretada como excelente (valores na curva ROC entre 0,9 e 1,0), bom (0,8-0,9), razoável (0,7-0,8), pobre (0,6-0,7), fraco (0,5-0,6) (TAPE, 2013). Utilizou-se o programa SPSS *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software, versão 17.0, EUA) para a realização dos testes Qui-quadrado, Exato de Fisher, Regressão Logística Binária e Kappa. Para análise da Curva ROC utilizou-se o programa MedCalc (versão 12.0.3.0, Bélgica).

6 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de raspado cervical de 325 mulheres sexualmente ativas com média de idade de 37 anos (14-79 anos). A faixa de idade inferior ou igual a 30 anos (≤ 30 anos) representou 36,6% (119) das amostras enquanto a faixa etária com idade superior a 30 anos (> 30 anos) representou 63,4% (206).

A prevalência do DNA de HPV foi de 24,6% (80/325) na amostra estudada. Já em relação à CT, a prevalência foi de 11,1% (36/325) e a prevalência de coinfeção para HPV e CT foi de 4,6% (15/325).

Na tabela 3, está descrita a distribuição das variáveis estudadas e sua associação com a presença de HPV, CT e coinfeção HPV/CT. Observa-se que houve diferença significativa entre as mulheres positivas e negativas para o HPV em relação às variáveis: citologia ($p < 0,001$), idade ($p = 0,001$), idade de início da atividade sexual ($p = 0,008$) e o uso de anticoncepcional oral ($p = 0,048$). A frequência da positividade para HPV foi de 100% para mulheres com citologia alterada (LSIL e ASCUS) e de 22,2% para mulheres com citologia normal. A frequência da infecção pelo HPV foi maior em mulheres com idade inferior ou igual a 30 anos, em mulheres que tiveram a primeira relação sexual com idade inferior ou igual a 18 anos e em mulheres que fazem uso de anticoncepcional oral.

Para CT, observou-se que houve diferença significativa entre as mulheres positivas e negativas em relação ao número de parceiros ao longo da vida ($p = 0,048$). A frequência da infecção por CT foi maior em mulheres que tiveram dois ou mais parceiros ao longo da vida quando comparada às mulheres que tiveram um parceiro. Em relação à presença da coinfeção HPV/CT, observou-se que houve diferença significativa entre as mulheres coinfectadas e não coinfectadas em relação às variáveis idade ($p = 0,006$) e uso de anticoncepcional oral ($p = 0,011$). A frequência de coinfeção foi maior em mulheres com idade inferior ou igual a 30 anos e em mulheres que fazem uso de anticoncepcional oral.

Tabela 3: Distribuição das variáveis estudadas de acordo com a presença de HPV, CT e Coinfecção HPV/CT.

Variáveis	HPV (-)	HPV (+)	P*	CT (-)	CT (+)	P*	Coinfecção (-)	Coinfecção (-)	P*
Citologia (325)	245	80		289	36		310	15	
Normal (n=315)	77,8% (245)	22,2% (70)	<0,001	88,9% (280)	11,1% (35)	0,462	95,6% (301)	4,4% (14)	0,196
LSIL (n=5)	0% (0)	100% (5)		100% (6)	0% (0)		100% (6)	0,0% (0)	
ASCUS (n=7)	0% (0)	100% (7)		75,0% (3)	25,0% (1)		75,0% (3)	25,0% (1)	
Corrimento vaginal (325)	245	80		289	36		310	15	
Não (n=208)	77,9% (162)	22,1% (46)	0,163	89,9% (187)	10,1% (21)	0,453	95,2% (1198)	4,8% (10)	0,826
Sim (n=117)	70,9% (83)	29,1% (34)		87,2% (102)	12,8% (15)		95,7% (112)	4,3% (5)	
Idade (325)	245	80		289	36		310	15	
≤ 30 anos (n=124)	65,3% (81)	34,7% (43)	0,001	87,1% (108)	12,9% (16)	0,410	91,1% (113)	8,9% (11)	0,006
> 30 anos (n=201)	81,6% (164)	18,4% (37)		90,0% (181)	10,0% (20)		98,0% (197)	2,0% (4)	
Nº de Parceiros ao longo da vida (325)	245	80		289	36		310	15	
1 (n=109)	71,6% (78)	28,4% (31)	0,255	93,6% (102)	6,4% (7)	0,048	95,4% (104)	4,6% (5)	0,986
2 ou mais (n=216)	77,3% (167)	22,7% (49)		86,6% (187)	13,4% (29)		95,4% (206)	4,6% (10)	

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

Tabela 3: Distribuição das variáveis estudadas de acordo com a presença de HPV, CT e Coinfecção HPV/CT (continuação).

Início da atividade sexual (325)	245	80		289	36		310	15	
≤ 18 anos (n=244)	71,7% (175)	28,3% (69)	0,008	87,7% (214)	12,3% (30)	0,225	94,3% (230)	5,7% (14)	0,128
> 18 anos (n=81)	86,4% (70)	13,6% (11)		92,6% (75)	7,4% (6)		98,8% (80)	1,2% (1)	
Uso de preservativos (325)	245	80	0,168	289	36	0,951	310	15	0,266
Sim, sempre (n=53)	67,9% (36)	32,1% (17)		88,7% (47)	11,3% (6)		92,5% (49)	7,5% (4)	
Não ou às vezes (n= 272)	76,8% (209)	23,2% (63)		89,0% (242)	11,0% (30)		96,0% (261)	4,0% (11)	
Uso de Anticoncepcional Oral (325)	245	80	0,048	289	36	0,103	310	15	0,011
Não (n=168)	79,8% (134)	20,2% (34)		91,7% (154)	8,3% (14)		98,2% (165)	1,8% (3)	
Sim (n= 157)	70,7% (111)	29,3% (46)		86,0% (135)	14,0% (22)		92,4% (145)	7,6% (12)	
Dispositivo Intrauterino (DIU) (325)	245	80	1,000	289	36	0,605	310	15	1,000
Não (n=317)	75,4% (239)	78% (24,6)		88,6% (281)	11,4% (36)		95,3% (302)	4,7% (15)	
Sim (n=8)	75,0% (6)	25% (2)		88,9% (289)	0,0% (0)		100,0% (8)	0,0% (0)	

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

Na tabela 4, está descrita a associação entre a positividade para CT e para HPV. Observou-se que houve diferença significativa entre as mulheres positivas e negativas para o HPV em relação à presença da infecção por CT ($p=0,012$). A frequência da positividade para HPV foi maior em mulheres que foram positivas para CT. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre tipos de HPV de alto risco e a infecção por CT ($p=0,162$).

Na figura 7, estão descritas as prevalências de infecção pelo HPV, CT, coinfeção HPV/CT e presença de HPV de alto risco de acordo com a faixa etária. As prevalências das infecções pelo HPV, CT, coinfeção HPV/CT e HPVs de alto risco foram maiores em mulheres com idade igual ou inferior a 24 anos. Com exceção da prevalência da infecção pela CT e da coinfeção CT/HPV, as demais decresceram com o aumento da idade. As prevalências da infecção pela CT e a coinfeção CT/HPV tiveram um comportamento decrescente com o aumento da idade até atingir os 54 anos. Entretanto, um novo pico foi observado para mulheres com idade superior a 55 anos, porém em menor proporção para a coinfeção.

Tabela 4: Associação entre a positividade para *Chlamydia trachomatis* e HPV

	HPV Negativo	HPV Positivo	Total	p*
<i>Chlamydia trachomatis</i>				0,012
Negativo	224(77,5%)	65 (8,6%)	289 (100%)	
Positivo	21 (58,3%)	15 (41,7%)	36 (100%)	
Total	245 (100%)	80(100%)	325 (100%)	

*Valores de p para teste Qui-Quadrado

Na tabela 5, estão descritas as Razões de Chance (RC) com o intervalo de confiança (IC) de 95% para a associação entre as variáveis estudadas e os desfechos. Mulheres com citologia normal têm 99,7% menos chance de ter HPV do que mulheres com alteração citológica LSIL ou ASCUS, $RC= 0,028$ e IC 95% (0,003-0,226), $p= 0,001$. Mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos têm 1,9 vezes mais chance de ter HPV do que mulheres com idade superior a 30 anos, $RC= 1,971$ e IC 95% (1,095-3,547), $p= 0,024$. Mulheres com dois ou mais parceiros ao longo da vida têm 1,7 vezes mais chance de ter HPV do que mulheres que têm somente um parceiro, $RC= 1,78$ e IC 95% (1,0004-

3,155), $p=0,048$. Mulheres que tiveram sua primeira relação sexual com idade inferior ou igual a 18 anos têm 2,2 vezes mais chance de ter HPV do que mulheres que tiveram sua primeira relação sexual após os 18 anos de idade $RC=2,250$ e $IC\ 95\% (1,0062-4,764)$, $p=0,034$. Em relação às demais variáveis estudadas, como uso de preservativos e uso de anticoncepcional oral, não foi encontrada associação estatisticamente significativa com a positividade do HPV. Não foi encontrada associação das variáveis estudadas com os desfechos positividade para CT e positividade para a coinfeção HPV/CT. Para a associação entre HPV e CT, mulheres com amostras positivas para CT têm 2,4 vezes mais chances de ter HPV do que mulheres com amostras negativas $RC=2,462$ e $IC\ 95\% (1,201-5,046)$, $p=0,014$ e vice-versa.

A prevalência dos tipos de HPV encontrados no estudo foi baseada nos resultados do *microarray*, RFLP e sequenciamento. Para os tipos de HPV não identificados pelo *microarray*, a amostra foi considerada positiva se uma ou ambas as metodologias, RFLP e sequenciamento detectaram o tipo viral presente. A frequência global e estratificada por metodologia está descrita na Tabela 6.

O HPV 16 foi o tipo mais prevalente (38,8%), seguido pelos tipos 39 (23,8%), 53 (22,5%), 68 (15,0%), 56, 31 e 66 (10,0%), 44/55 e 45 (8,8%), 43 e 52 (7,5%), 18 e 62 (6,3%), 06, 11, 35, 51, 73 e 89 (5,0%). Também foram detectados outros tipos menos prevalentes como HPV 42 e 61 (3,8%), 58 e 59 (2,5%), 32, 33, 40, 70, 74, 82, 83 e 84 (1,3%).

Figura 7: Frequência da positividade do HPV, CT, coinfeção HPV/CT e presença de HPVs oncogênicos na população estudada de acordo com a faixa etária.

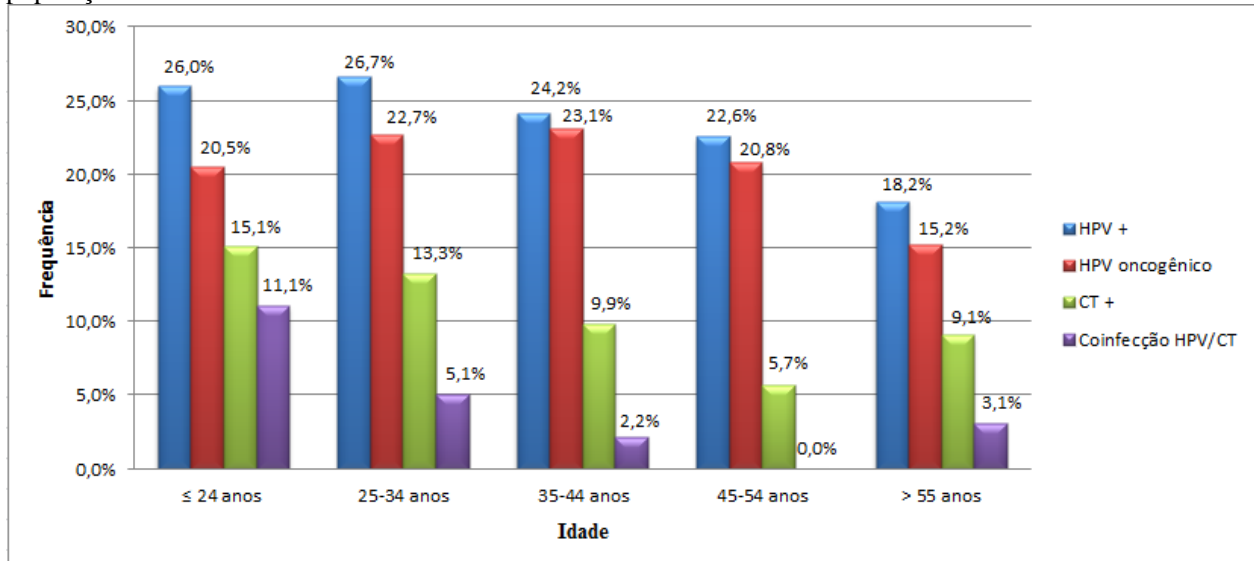


Tabela 5: Razões de Chances (RC) e Intervalo de Confiança (IC) de 95% da Associação entre as variáveis estudadas e a presença de HPV, CT e coinfeção.

Variáveis	HPV RC (IC 95%)	p*	CT RC (IC 95%)	p*	Coinfeção RC (IC 95%)	p*
Citologia						
Normal	0,028 (0,003-0,226)	0,001	1,558 (0,003-5,488)	0,680	0,606 (0,067-5,488)	0,656
LSIL ou ASCUS (Ref.)	1		1		1	
Idade						
≤ 30 anos	1,971 (1,095-3,547)	0,024	1,038 (0,488-2,206)	0,923	2,905 (0,851-9,916)	0,089
> 30 anos (Ref.)	1		1		1	
Nº de Parceiros ao longo da vida						
1 (Ref.)	1	0,048	1	0,091	1	0,091
2 ou mais	1,780 (1,004-3,155)		2,116 (0,886- 5,055)		0,830 (0,265-2,602)	
Início da atividade sexual						
≤ 18 anos	2,250 (1,062-4,764)	0,034	1,454 (0,559-3,784)	0,443	3,931 (0,468-33,005)	0,207
> 18 anos (Ref.)	1		1		1	
Uso de preservativos						
Sim, sempre (Ref.)	1	0,064	1	0,761	1	0,179
Não ou às vezes	1,916 (0,962-3,818)		0,862 (0,330- 2,250)		0,420 (0,118-1,490)	
Uso de Anticoncepcional Oral						
Não (Ref.)	1	0,514	1	0,205	1	0,121
Sim	0,833 (0,463-1,497)		1,632(0,765-3,483)		2,922 (0,753-11,339)	

Razão de Chance (RC); Intervalo de Confiança para a RC de 95% (IC 95%). *Valores de p para teste de Regressão Logística.

O Papillocheck[®] (*microarray*) não distingue entre os tipos virais 44 e 55, por isso, eles foram considerados como HPV44/55 quando foram positivos nesta metodologia. Dentre as sete amostras que foram consideradas como HPV 44/55, três foram genotipadas pelo RFLP, duas como HPV 55 e uma como HPV 44. Dentre as genotipadas pelo RFLP, uma também foi identificada como HPV 55 no sequenciamento. As cinco restantes permaneceram sem distinção entre os tipos virais. Entretanto, adotou-se o genótipo HPV44/55 para o cálculo de frequência dos tipos virais presentes no estudo, visto que ambos são considerados tipos de HPV de baixo risco.

A genotipagem das amostras pelas três metodologias, RFLP, sequenciamento e *microarray*, mostrou 32 genótipos diferentes de HPV. Dentre eles, 15 classificados como baixo risco (06, 11, 32, 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 70, 74, 83, 84 e 89), dois classificados como possivelmente carcinogênicos (53 e 66), e 15 classificados como alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82).

Em relação aos tipos de HPV de alto risco, o mais prevalente foi o HPV 16, seguido pelos HPVs 39, 68, 56, 31, 45, 52, 18, 35, 51, 73, 58, 59, 33, 70 e 82. Dentre os possivelmente carcinogênicos, o HPV 53 foi o mais prevalente seguido pelo HPV 66. Já em relação aos tipos de HPV de baixo risco, o mais prevalente foi o HPV44/55 seguido pelos HPVs 43, 62, 6, 11, 89, 42, 61, 32, 40, 74, 83 e 84.

Dentre as mulheres com amostras positivas para HPV, 32,5% (24/80) apresentaram positividade para um único tipo de HPV e 67,5% (54/80) foram positivas para dois ou mais tipos de HPV. Do total de mulheres monoinfectadas, 54,2% (13/24) foram positivas para HPVs de alto risco e destas, 53,8% (7/13) foram positivas para HPV 16.

Em relação às mulheres infectadas com mais de um tipo de HPV, 55,5% (30/54) delas têm dois tipos, 20,4% (11/54) têm três tipos e 24,1% (13/54) têm quatro ou mais tipos. Em mulheres infectadas com dois ou mais tipos de HPV, verificou-se que à medida que aumenta o número de tipos virais, aumenta o número de tipos oncogênicos. Dentre as mulheres com infecção por dois tipos de HPV, 93,3% (28/30) têm pelo menos um HPV de alto risco e destas 53,5% (15/28) têm HPV 16 e/ou 18. Dentre as mulheres com infecção por mais de dois tipos de HPV, 72,7% (8/11) têm pelo menos dois tipos de HPV de alto risco, e destas 75% (6/8) têm HPV 16. No que diz respeito às mulheres com infecções múltiplas, 46,1% (6/8) delas têm pelo menos três tipos de HPV de alto risco, e destas, todas têm HPV 16 e/ou HPV 18.

As mulheres com citologia alterada representaram 15% (12/80) do grupo de mulheres positiva para HPV e destas, 58,3% (7/12) receberam o diagnóstico de ASCUS e 41,6% (5/12) receberam de LSIL. Dentre as mulheres com ASCUS, 42,9% (3/7) não se pode descartar HSIL (ASC-H). Nesta amostra, a infecção por um tipo de HPV representou 41,7% (5/12) e a infecção por dois ou mais tipos representou 58,3% (7/12). O HPV 16 foi detectado em 41,6% das mulheres. As alterações citológicas, idade da paciente e os tipos de HPV presentes na amostra estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Alterações citológicas encontradas em amostras, idade da paciente e tipo de HPV presente na amostra.

Nº Indetificação	Idade	Tipos de HPV	Citologia
02	21	16, 33, 39, 51, 52	ASC- H
18	47	58	ASC- H
27	35	16	ASC- H
470	22	16, 56, 39 e 82	ASC - US
485	45	53 e 31	ASC- US
312	25	16	ASC- US
33	33	35 e 68	ASC- US
66	36	53	LSIL
295	28	16, 18, e 39	LSIL
329	19	53	LSIL
347	24	16 e 35	LSIL
486	18	45, 56 e 66	LSIL

ASC-H- Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado não podendo excluir HSIL

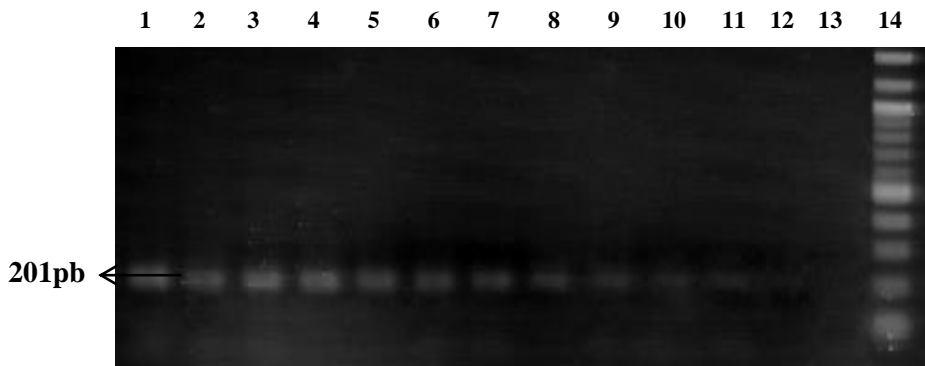
ASC-US - Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado

LSIL- Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

6.1 PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DE CT E OBTENÇÃO DO CONTROLE POSITIVO PARA A CT

Na Figura 8, pode ser observada a curva de concentração dos *amplicons* de 201pb de CT clonados. A sensibilidade da reação foi de 48,75 pg/ μ L.

Figura 8: Curva de concentração de DNA plasmidial de CT.



Canaleta 1- 100 ng/ μ L; canaleta 2- 50 ng/ μ L; canaleta 3- 25 ng/ μ L; canaleta 4- 12,5 ng/ μ L; canaleta 5- 6,25 ng/ μ L; canaleta 6- 3,125 ng/ μ L; canaleta 7- 1,563 ng/ μ L; canaleta 8- 0,78 ng/ μ L; canaleta 9- 0,39 ng/ μ L; canaleta 10- 0,195 ng/ μ L, canaleta 11- 97,5 pg/ μ L, canaleta 12- 48,75 pg/ μ L, canaleta 13- CN, canaleta 14- ladder de 100pb.

6.2 CLONAGENS PARA OBTENÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS PARA CT E HPV

6.2.1 Clonagem do controle positivo para CT

Para verificar a identidade do clone de controle positivo para CT foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* clonados.

A análise da sequência de 201pb gerada por sequenciamento automático do plasmídeo críptico e seu posterior alinhamento no software BLAST revelou 99% de complementariedade com a sequência do plasmídeo críptico de CT no GenBank sob número de acesso X06707.3 (Figura 9).

Figura 9: Alinhamento da sequência de 201pb do plasmídeo críptico de *Chlamydia trachomatis* clonado com a sequência do plasmídeo críptico da *Chlamydia trachomatis* (PLGV 440) depositada no GenBank sob número de acesso X06707.3

201pb	7	TTTGG-CAGCTGCT-ATGCATGGTAATGAGATGAAAGAAAATCAAGACCTATAACTTCTA	64
PLGV 440	3753	TTTGGATAGCTGCTAATGCATGGTAATGAGATGAAAGAAAATCAAGACCTATAACTTCTA	3694
201pb	65	CCATCCCAATTTGAGCCAATTTGGGAGATATCTTAATAGATTGACCAGGTCCTCTCCAA	124
PLGV 440	3693	CCATCCCAATTTGAGCCAATTTGGGAGATATCTTAATAGATTGACCAGGTCCTCTCCAA	3634
201pb	125	ACTTCTGATTTTCAAGTGGATAGGACCTTTGATGAAGTGGCAGTTACTA	174
PLGV 440	3633	ACTTCTGATTTTCAAGTGGATAGGACCTTTGATGAAGTGGCAGTTACTA	3584

6.2.2 Clonagem do controle positivo para HPV

Para verificar a identidade do clone de controle positivo para HPV foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* clonados.

A análise da sequência de 450pb gerado por sequenciamento automático e posterior alinhamento no software BLAST revelou 99% de complementariedade com a sequência do gene L1 do HPV 33 depositada no GenBank sob número de acesso DQ 486473.1 (Figura 10).

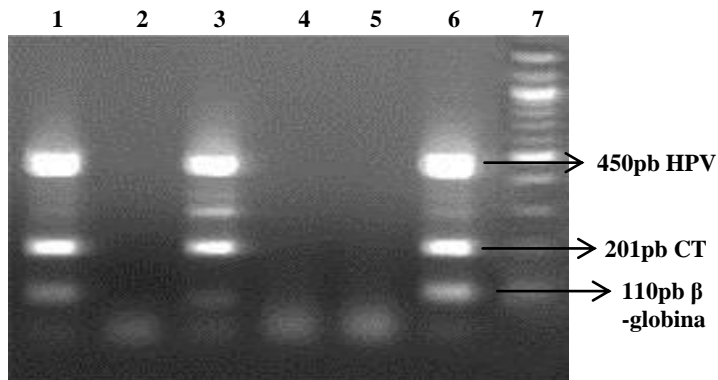
Figura 10: Alinhamento da sequência de 450pb gerada por sequenciamento automático do gene L1 do HPV clonado com a sequência do gene L1 do HPV 33 depositada no GenBank sob número de acesso DQ 486473.1.

450pb	122	GCACAGGGACATAACAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGAT	181
L1 HPV 1		GCACAGGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGAT	60
450pb	182	ACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATAAA	241
L1 HPV 61		ACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATAAA	120
450pb	242	AATGAAAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGTTTT	301
L1 HPV 121		AATGAAAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGTTTT	180
450pb	302	CAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGAAGTTATGACATATATTATGCTATGAATCCA	361
L1 HPV 181		CAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGAAGTTATGACATATATTATGCTATGAATCCA	240
450pb	362	GATATTTTAGAAGATTGGCAATTGGTTTACACCTCCTCCATCTGCTAGTTTACAGGAT	421
L1 HPV 241		GATATTTTAGAAGATTGGCAATTGGTTTACACCTCCTCCATCTGCTAGTTTACAGGAT	300
450pb	422	ACCTATAGGTTTGTTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAAACAGTACCTCCAAAGGAA	481
L1 HPV 301		ACCTATAGGTTTGTTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAAACAGTACCTCCAAAGGAA	360
450pb	482	AAGGAAGAACCCTTAGGTAATATACATTTGGGAAGTGGATTTAAAGGAAAAATTTTCA	541
L1 HPV 361		AAGGAAGACCCTTAGGTAATATACATTTGGGAAGTGGATTTAAAGGAAAAATTTTCA	420
450pb	542	GCAGATCTAGATCAGTTTCCCTGGGACG	570
L1 HPV 421		GCAGATTTAGATCAGTTTCCCTGGGACG	449

6.3 PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DO DNA DO HPV E CT

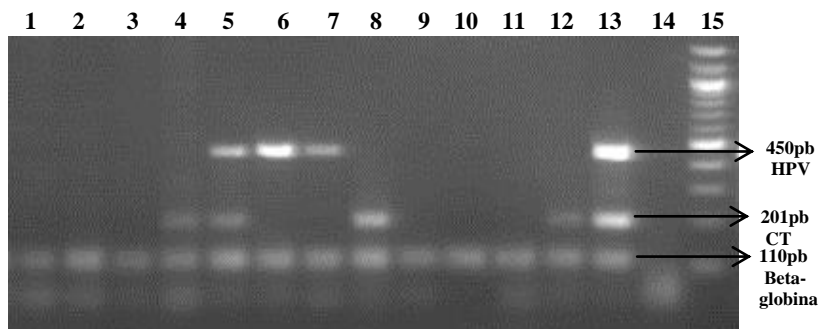
A PCR- multiplex foi padronizada utilizando-se os clones de HPV 33, e de CT com o kit QIAGEN® Multiplex PCR. Para controle interno da reação e controle da presença de inibidores foi utilizado o gene da beta-globina humana com os iniciadores PCO3/PCO4. Foram testadas as temperaturas de pareamento (55 °C a 58 °C). A melhor temperatura de pareamento foi de 58 °C (Figura 11). A aplicação da PCR multiplex nas amostras clínicas é visualida na Figura 12.

Figura 11: Padronização da temperatura de pareamento dos primes PGMY09/11, CTP1/CTP2 e β -globina, na PCR multiplex.



Canaleta 1- Controle Positivo (CP) HPV 33, CT e β -globina, canaleta 2 – Controle Negativo (CN) na temperatura de 58°C; canaleta 3, CP HPV 33, CT e β -globina, canaleta 4, CN na temperatura de 56°C; canaleta 5, CN, canaleta 6, CP HPV 33, CT e β -globina na temperatura de 55°C. Canaleta 7 marcador de tamanho molecular de 100pb.

Figura 12: PCR multiplex para a detecção do DNA de HPV, CT e β -globina humana em amostras clínicas.

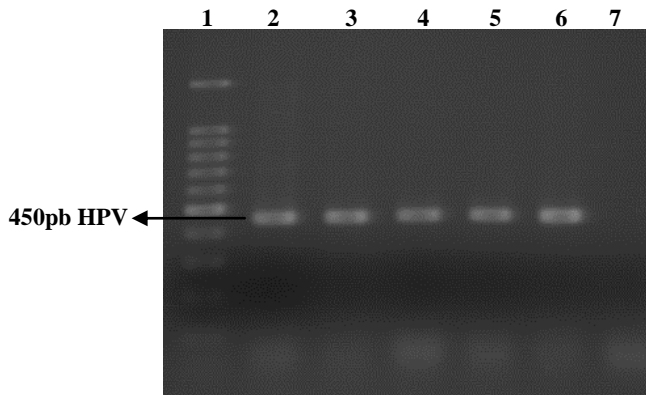


Canaletas 1 a 12, amostras clínicas, canaletas 13: CP HPV 33, CT e β -globina, canaleta 14: CN e canaleta 15, marcador de tamanho molecular de 100pb. Amostras 4, 8 e 12 foram positivas para CT; Amostras 6 e 7, foram positivas para HPV; e a amostra 5, foi positiva para HPV e CT; as demais amostras foram positivas somente para o gene da β -globina.

6.4 PCR COM OS INICIADORES PGMY0911 PARA A GENOTIPAGEM DO HPV

As amostras com resultados positivos para DNA de HPV na PCR multiplex foram submetidas a PCR com os iniciadores PGMY09/11 para a amplificação de um segmento de 450pb da região L1 do HPV (Figura 13).

Figura 13: Aplicação da PCR com os iniciadores PGMY0911 em amostras cervicais positivas para HPV na reação PCR-Multiplex.

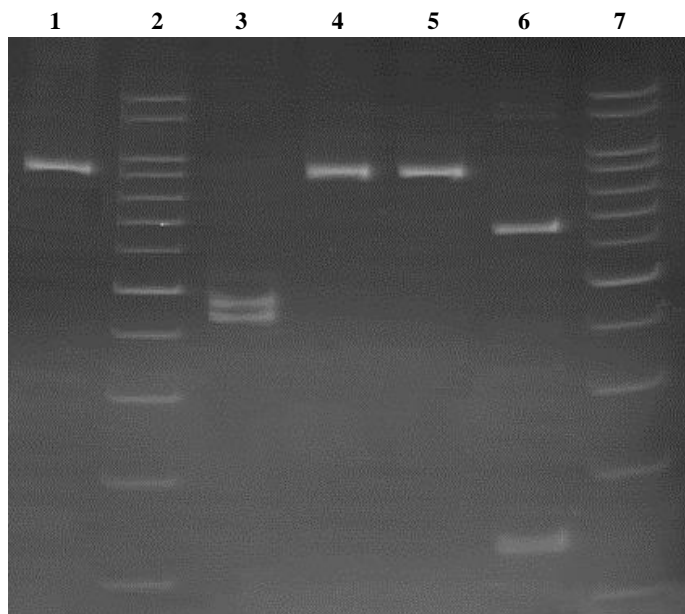


Canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100pb; canaletas 2 a 5, amostras cervicais positivas para HPV (450pb), canaleta 6: controle positivo para HPV 33 e canaleta 7: controle negativo.

6.5 POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Do total das 80 amostras positivas para HPV na PCR com os iniciadores PGMY0911, 70 (87,50%) foram genotipadas pela técnica de PCR-RFLP e dez foram inconclusivas (12,5%). Dentre essas amostras, três (42,2%) foram inconclusiva em virtude da intensidade da banda da PCR apresentar-se muito fraca. Na figura 14, pode ser observada a genotipagem do HPV 16 em amostras clínicas.

Figura 14: Genotipagem de amostra clínica por PCR-RFLP do HPV 16 em gel de poliacrilamida 12%.



Canaleta 1: produto de PCR não digerido (450pb); canaleta 2: marcador de tamanho molecular de 50pb; canaleta 3: fragmentação do produto de PCR com a enzima Pst I (210/216 pb); canaleta 4: fragmentação do produto de PCR com a enzima Hae III (450pb); canaleta 5: fragmentação do produto de PCR com a enzima Ddel (450pb); canaleta 6: fragmentação do produto de PCR com a enzima Rsa I (310/70/72pb) e canaleta 7: marcador de tamanho molecular de 50pb.

Pela metodologia PCR-RFLP, foram identificados ao total 28 tipos de HPV: 12 classificados como baixo risco (06, 11, 32, 44, 55, 61, 62, 70, 74, 83, 84 e 89), dois classificados como possivelmente carcinogênicos (53 e 66), e 14 classificados como alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68, 69 e 73).

Na Tabela 8, são descritos os tipos de coinfeção identificados em 20 amostras pelo método de RFLP.

Tabela 8: Tipos de coinfeção identificados pelo método RFLP.

Tipo de Coinfeção	Frequencia (%)
HPV alto risco/HPV alto risco	9 (45%)
HPV alto risco/ HPV possivelmente carcinogênico	5 (25%)
HPV alto risco/HPV baixo risco	4 (20%)
HPV baixo risco/HPV baixo risco	1(5%)
HPV baixo/HPV possivelmente carcinogênico	1(5%)
Total	20 (100%)

6.6 SEQUENCIAMENTO

Do total das 80 amostras positivas para HPV na PCR com os iniciadores PGMY0911, 76 (95%) foram genotipadas pelo sequenciamento e quatro (5%) foram inconclusivas.

O sequenciamento identificou 24 tipos de HPV, sendo 10 classificados como baixo risco (06, 11, 32, 55, 61, 62, 74, 83, 84 e 89), dois classificados como possivelmente carcinogênicos (53 e 66) e 12 tipos classificados como alto risco (16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68 e 73).

O sequenciamento detectou uma coinfeção (HPV16/HPV45) e 75 monoinfecções nas 80 amostras analisadas. Na Figura 15, pode ser observado o eletroferograma do seguimento de 450pb do gene L1 do HPV 53 de amostra clínica obtida pela PCR com os iniciadores PGMY0911. A análise da mesma sequência por sequenciamento automático e posterior alinhamento no software BLAST revelou 100% de complementariedade com a sequência do gene L1 do HPV 53 depositada no GenBank sob número de acesso JN393898.1 (Figura 16).

6.7 MICROARRAY – KIT PAPILOCHECK® (GREINER BIO-ONE)

Do total das 80 amostras positivas para HPV pela PCR com os iniciadores PGMY0911, 72 (90,0%) foram genotipadas pelo Papillocheck® e oito (10,0%) foram negativas. Todas as oito amostras negativas no Papillocheck® foram genotipadas pelo sequenciamento e pelo RFLP e identificaram tipos de HPV não genotipados pelo Papillocheck®. Dentre as amostras não detectadas pelo Papillocheck®, duas foram identificadas como HPV 61, uma como HPV 74, uma como HPV 83, uma como HPV 84 e três como HPV 89.

Pelo método *microarray* foram identificados ao total 24 genótipos de HPV: seis classificados como baixo risco (6, 11, 40, 42, 43 e 44/55), dois classificados como possivelmente carcinogênicos (53 e 66), e 16 classificados como alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70, 73 e 82).

O papillocheck® detectou 50 amostras (62,5%) com mais de um tipo de HPV e 30 (37,5%) com um único tipo. Na Figura 17, pode ser observada a genotipagem dos HPVs 16, 39, 56 e 82 em uma amostra clínica pela metodologia de *microarray* (Papillocheck®).

Figura 17: Genotipagem de amostra clínica pela metodologia de *microarray* (Papillocheck®).

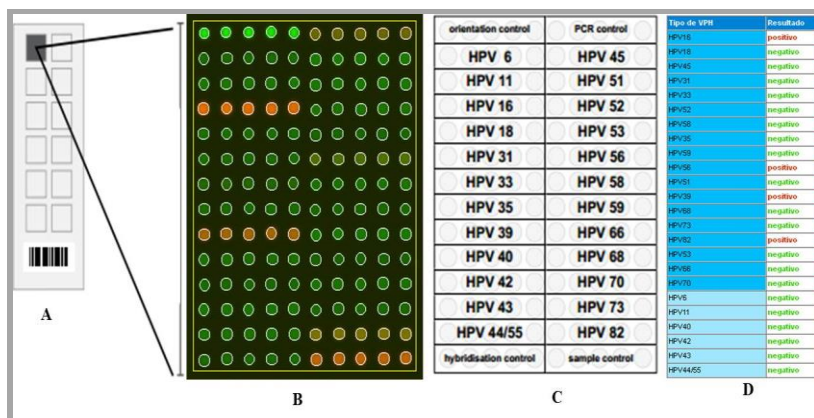


Figura 17-A: Cada um dos 12 poços do chip de DNA contém um *microarray* com 28 sondas diferentes dispostas em replicatas de cinco cada uma, como pode ser observado na figura, além das regiões de controle. Figura 17-B: leitura dos *microarrays* em filtro vermelho (635nm) no *CheckReport™ Software* de amostra clínica. Poços com coloração verde indicam amostra negativa, poços com coloração vermelha ou verde alaranjada representam amostra positiva. Figura 17-C: Desenho esquemático da disposição dos arranjos de *microarray* do Papillocheck®. São indicadas as sondas tipo específicas de cada tipo de HPV e controles do chip. Figura 17-D: Janela dos resultados no *CheckReport™ Software*, a amostra é positiva para HPV 16, HPV 39, HPV 56 e HPV 82.

6.8 ANÁLISE DA GENOTIPAGEM DO HPV PELOS MÉTODOS PCR-RFLP, SEQUENCIAMENTO E PAPILOCHECK®

Do total de amostras analisadas, as três metodologias foram concordantes em relação à genotipagem de pelo menos um tipo de HPV em 71,25% (57/80) das amostras. A genotipagem de 93,75% (75/80) das amostras foi concordante em pelo menos duas metodologias e 6,25% (5/80) foram discordantes nas três metodologias. Uma amostra foi positiva para o HPV 68 nas metodologias de PCR-RFLP e sequenciamento e HPV 39 no *microarray*, embora o *microarray* detecte o HPV 68 (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras não concordantes entre as três metodologias de genotipagem do HPV

N° do Registro	RFLP	Sequenciamento	Papillocheck®	Conclusão
3	HPV 16	Inconclusiva	HPV 16	Amostra concordante em 2 metodologias
103	HPV 68	Inconclusiva	HPV 68 e 11	Amostra concordante em 2 metodologias
247	Inconclusiva	HPV 35	HPV 11, 35, 42 e 73	Amostra concordante em 2 metodologias
295	HPV 16 e 18	Inconclusiva	HPV 16, 18, e 39	Amostra concordante em 2 metodologias
320	HPV 68	HPV 68	HPV 39	Amostra concordante em 2 metodologias
454	Inconclusiva	HPV 06	HPV 06, 16, 43, 44/55, 53 e 56	Amostra concordante em 2 metodologias
456	Inconclusiva	HPV 16	HPV 16 e 39	Amostra concordante em 2 metodologias
470	Inconclusiva	HPV 16	16, 56, 39 e 82	Amostra concordante em 2 metodologias
375	HPV 16	Inconclusiva	HPV 16 e 39	Amostra concordante em 2 metodologias
4	HPV 52	HPV 52	HPV 16 e 53	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
25	HPV 61	HPV 61	Negativo	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
30	HPV 84	HPV 84	Negativo	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
57	Inconclusiva	HPV 62	HPV 56	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
130	HPV 61	HPV 61	HPV 53, 44/55	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
227	HPV 61	HPV 61	Negativo	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
250	HPV 89	HPV 89	Negativo	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
261	HPV 62	HPV 62	HPV 53	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
338	HPV 74	HPV 74	Negativo	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
349	HPV 32	HPV 32	HPV 11 e 39	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
387	Inconclusiva	HPV 61	HPV 16 e 66	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
393	Inconclusiva	HPV 89	Negativo	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
474	Inconclusiva	HPV 61	HPV 43, 45, 59 e 68	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®
667	Inconclusiva	HPV 62	HPV 56	Tipo de HPV não detectado pelo Papillocheck®

6.8.1- Concordância entre o método PCR-RFLP e os métodos de sequenciamento e *microarray* (Papillocheck®) para a genotipagem do HPV

Para estimar o grau de concordância entre o método RFLP e os métodos de sequenciamento e *microarray* (Papillocheck®) foi utilizado o Teste Kappa. A concordância da genotipagem entre os métodos foi perfeita para os tipos de HPVs 32, 33, 70, 74, 83 e 84, muito boa para os tipos 16 e 51, boa para os tipos virais 18, 55, 59, 66, 68, 73, 61 e 89, moderada para os tipos 45, 52, 53 e 58 (Tabela 10), razoável para os tipos 6, 11, 35, 44 e 62 e pobre para os tipos 31 e 39. Não houve concordância entre as metodologias para os tipos virais, 40, 42, 43, 56 e 82, pois estes tipos foram identificados somente pelo Papillocheck® (Tabela 11).

Tabela 10: Graus de concordância perfeita, muito boa e boa entre a metodologia PCR-RFLP e as metodologias *microarray* (Papillocheck®) e sequenciamento para genotipagem do HPV.

Tipos de HPV	Valor de Kappa	P * (IC 95%)	Concordância
HPV 32	1,000	<0,001 (0,000-0,059)	Perfeita
HPV 33	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 70	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 74	1,000	0,013 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 83	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 84	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 16	0,808	<0,001 (0,000-0,037)	Muito boa
HPV 51	0,851	<0,001 (0,000-0,037)	Muito boa
HPV 18	0,787	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 55	0,661	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 59	0,661	0,038 (0,000-0,079)	Boa
HPV 66	0,643	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 68	0,728	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 73	0,655	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 61	0,738	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 89	0,655	<0,001 (0,000-0,037)	Boa

*Valores de p para teste Kappa

Tabela 11: Graus de concordância moderada, razoável, pobre e sem concordância para a metodologia PCR-RFLP e as metodologias *microarray* (Papillocheck[®]) e sequenciamento para genotipagem do HPV.

Tipos de HPV	Valor de Kappa	P * (IC 95%)	Concordância
HPV 45	0,578	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 52	0,415	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 53	0,660	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 58	0,787	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 06	0,388	<0,001 (0,026-0,146)	Razoável
HPV 11	0,388	0,038 (0,000-0,079)	Razoável
HPV 35	0,388	<0,001 (0,000-0,197)	Razoável
HPV 44	0,270	0,043 (0,009-0,116)	Razoável
HPV 62	0,556	<0,001 (0,000-0,037)	Razoável
HPV 31	0,174	0,003 (0,017-0,133)	Pobre
HPV 39	0,111	0,013 (0,002-0,098)	Pobre
HPV 40	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 42	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 43	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 56	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 82	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância

*Valores de p para teste Kappa

6.8.2- Concordância entre as metodologias PCR-RFLP e *microarray* (Papillocheck[®]) para genotipagem do HPV

Para estimar o grau de concordância entre o método PCR-RFLP e o *microarray* (Papillocheck[®]) foi utilizado o Teste Kappa. A concordância da genotipagem entre os métodos foi perfeita para os tipos de HPV's 33 e 58, muito boa para o tipo 51, boa para os tipos virais 16, 18, 53, 59, 66, 68, 70, e 73, moderada para os tipos 45 e 52, razoável para os tipos 6, 11, 35, 44/55 e pobre para os tipos 31, 39 e 55. Não houve concordância entre as metodologias para os tipos virais, 40, 42, 43, 56 e 82, pois estes tipos foram identificados somente pelo *microarray* (Tabela 12).

Tabela 12: Grau de concordância entre a metodologia PCR-RFLP e o *microarray* (Papillocheck®) para genotipagem do HPV.

Tipos de HPV	Valor de Kappa	P (IC 95%)	Concordância
HPV 33	1,000	0,025 (0,000-0,059)	Perfeita
HPV 58	1,000	<0,001 (0,000-0,059)	Perfeita
HPV 51	0,851	<0,001 (0,000-0,037)	Muito boa
HPV 16	0,668	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 18	0,787	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 53	0,660	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 59	0,661	0,013 (0,000-0,037)	Boa
HPV 66	0,643	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 68	0,541	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 70	0,661	0,038 (0,000-0,079)	Boa
HPV 73	0,655	0,013 (0,000-0,037)	Boa
HPV 45	0,578	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 52	0,415	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 06	0,388	0,013 (0,000-0,037)	Razoável
HPV 11	0,274	0,100 (0,034-0,166)	Razoável
HPV 35	0,274	0,05 (0,002-0,098)	Razoável
HPV 44/55	0,233	0,100 (0,034-0,166)	Razoável
HPV 31	0,205	0,163 (0,082-0,243)	Pobre
HPV 39	0,194	0,025 (0,000-0,059)	Pobre
HPV 55	0,191	0,037 (0,082-0,243)	Pobre
HPV 40	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 42	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 43	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 56	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância
HPV 82	0,000	(0,000-0,000)	Sem concordância

*Valores de p para teste Kappa

6.8.3- Concordância entre as metodologias PCR-RFLP e sequenciamento para a genotipagem do HPV

Para estimar o grau de concordância entre o método PCR-RFLP e o sequenciamento foi utilizado o Teste Kappa. A concordância da genotipagem entre os métodos foi perfeita para os tipos de HPV 33, 70, 32, 74, 83 e 84, muito boa para os tipos 16 e 51, boa para os tipos virais 18, 53, 55, 58, 59, 66, 68, 73, 61 e 89, moderada para os tipos 52 e 62, razoável para os tipos 6, 11, 35, 44 e 45 e pobre para os tipos 31 e 39 (Tabela 13).

Tabela 13: Grau de concordância entra a metodologia PCR-RFLP e o Sequenciamento para genotipagem do HPV.

Tipos de HPV	Valor de Kappa	P (IC 95%)	Concordância
HPV 33	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 70	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 32	1,000	<0,001 (0,000-0,059)	Perfeita
HPV 74	1,000	0,013 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 83	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 84	1,000	<0,001 (0,000-0,037)	Perfeita
HPV 16	0,808	<0,001 (0,000-0,037)	Muito Boa
HPV 51	0,794	<0,001 (0,000-0,037)	Muito Boa
HPV 18	0,787	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 53	0,660	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 55	0,661	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 58	0,787	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 59	0,661	0,038 (0,000-0,079)	Boa
HPV 66	0,643	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 68	0,728	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 73	0,655	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 61	0,738	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 89	0,655	<0,001 (0,000-0,037)	Boa
HPV 52	0,415	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 62	0,556	<0,001 (0,000-0,037)	Moderada
HPV 06	0,388	<0,001 (0,026-0,146)	Razoável
HPV 11	0,388	0,038 (0,000-0,079)	Razoável
HPV 35	0,388	<0,001 (0,000-0,197)	Razoável
HPV 44	0,270	0,063 (0,009-0,116)	Razoável
HPV 45	0,578	<0,001 (0,000-0,037)	Razoável
HPV 31	0,174	0,003 (0,017-0,133)	Pobre
HPV 39	0,111	<0,013 (0,002-0,098)	Pobre

*Valores de p para teste Kappa

6.8.4 – Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do PCR-RFLP

A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da genotipagem do HPV pelo PCR-RFLP foram calculados pela Curva ROC, adotando-se as metodologias de sequenciamento e *microarray* (Papillocheck®) como padrão áureo (Tabela 14).

A sensibilidade do método PCR-RFLP foi de 100,0% para os tipos de HPV 32, 33, 58, 70, 74, 83 e 84 e variou de 55,5% a 80,0%

para os tipos 18 (80,0%), 16 (77,4%), 11 e 51 (75,0%), 68 (61,5%) 61 (60,0%) e 53 (55,5%). Para os tipos 59, 66, 73 e 89, a sensibilidade foi de 50,0% e para os tipos 31 e 35 42,8%, para o HPV 45, 40,0% para o HPV 62, 33,3% para o HPV 52, 28,6% para o HPV 55, 25,0% para os tipos 06, 31 e 35, e inferior a 20,0% para os tipos 39 (15,8%) e 44 (14,3%). Para os tipos 06, 11, 70, 74, 83 e 84, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram estimados pelo software Microsoft Excel versão 2010. Não foi realizado o cálculo de sensibilidade para os tipos virais 40, 42, 43, 56 e 82, pois eles não foram identificados pelo PCR-RFLP. Embora a sensibilidade tenha sido baixa para alguns tipos virais, a especificidade mostrou-se elevada com valores entre 98,7% e 100,0% para todos os tipos virais genotipados (Tabela 14).

De acordo com a interpretação da área da Curva ROC, a genotipagem do HPV pelo método de PCR-RFLP mostrou-se excelente para os tipos de HPVs 32, 33 e 58, bom para os tipos 16, 18, 51, 53, 59, 61, 66, 68, 73 e 89, regular para os tipos 35, 45, 52, 55 e 62 e ruim para os tipos 31, 39 e 44 (Tabela 14).

Na figura 18, estão representadas as Curvas ROC da metodologia PCR-RFLP para os tipos de HPVs 16, 18, 51 e 58. Pode ser observada a sensibilidade e a especificidade para esses quatro tipos. A melhor sensibilidade e especificidade foram para HPV 58, seguidas pelos tipos virais 16, 18 e 51.

O VPP do PCR-RFLP foi de 100% para os tipos 6, 16, 31, 32, 33, 35, 44, 45, 51, 53, 55, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 73, 74, 83, 84 e 89; 80% para o HPV 18, 76,0% para o HPV 11, 75,0% para o HPV 39, e 66,7% para o HPV 52. O VPN foi de 100% para os tipos 32, 33, 58, 70, 74, 83, 84, variou de 91,1% a 98,7% para os tipos 06, 11, 18, 31, 35, 44, 45, 51, 52, 55, 59, 61, 62, 66, 68, 73 e 89. Para o HPV 16 foi de 83,0% e para o HPV 39 de 80,0% (Tabela 14).

Tabela 14: Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da genotipagem do HPV pelo PCR-RFLP adotando-se como padrão ouro a metodologia de *microarray* (Papillocheck®) e o sequenciamento.

RFLP	Tipo de HPV													
	HPV 32	HPV 33	HPV 58	HPV 70	HPV 74	HPV 83	HPV 84	HPV 18	HPV 16	HPV 11	HPV 51	HPV 68	HPV 61	HPV 53
Sensibilidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	80,0%	77,4%	75,0%	75,0%	61,5%	60,0%	55,5%
Especificidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	98,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Área da Curva	1	1	1	**	**	**	**	0,893	0,887	**	0,875	0,808	0,800	0,778
Conclusão	Excelente	Excelente	Excelente	**	**	**	**	Bom	Bom	**	Bom	Bom	Bom	Bom
IC 95%	0,954-1,000	0,954-1,000	0,954-1,000	**	**	**	**	0,804-0,951	0,631-0,868	**	0,782-0,938	0,704-0,887	0,696-0,881	0,671-0,863
VPP	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	80,00%	100,0%	76,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
VPN	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	98,70%	83,0%	96,0%	98,7%	93,1%	97,4%	86,6%

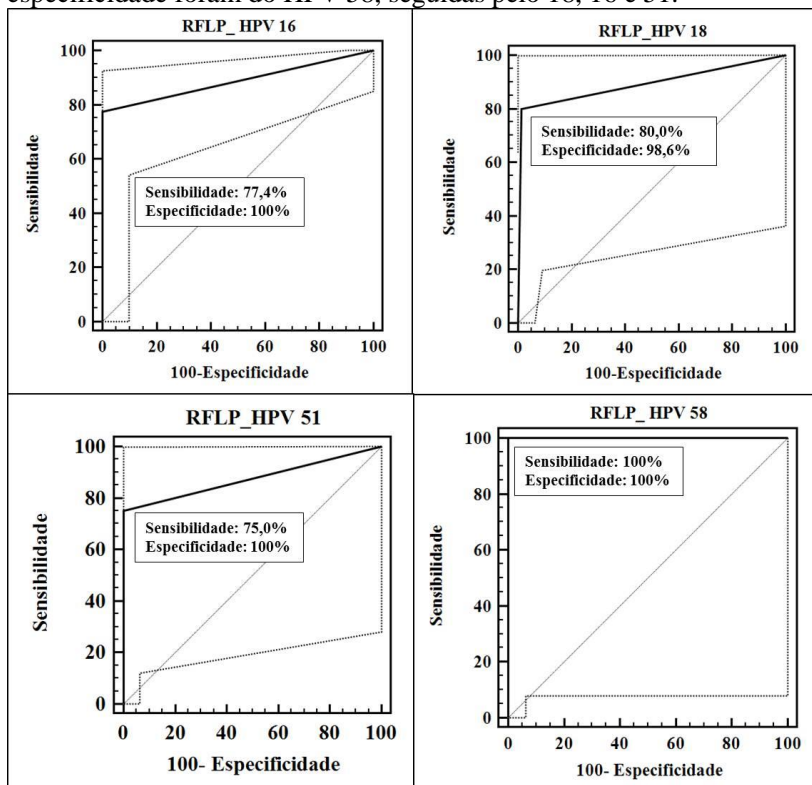
VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo; ** não foi possível análise pela Curva ROC.

Tabela 14: Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da genotipagem do HPV pelo PCR-RFLP adotando-se como padrão ouro a metodologia de *microarray* (Papillocheck®) e o sequenciamento. (*Continuação*).

RFLP	Tipo de HPV												
	HPV 59	HPV 66	HPV 73	HPV 89	HPV 45	HPV 62	HPV 52	HPV 55	HPV 35	HPV 06	HPV 31	HPV 39	HPV 44
Sensibilidade	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%	42,80%	40,00%	33,30%	28,60%	25,00%	25,00%	25,00%	15,80%	14,30%
Especificidade	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	98,70%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Área da Curva	0,75	0,75	0,75	0,75	0,714	0,7	0,66	0,643	0,625	**	0,562	0,571	0,571
Conclusão	Bom	Bom	Bom	Bom	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	**	Ruim	Ruim	Ruim
IC 95%	0,641-0,840	0,641-0,840	0,641-0,840	0,641-0,840	0,602-0,810	0,587-0,797	0,545-0,762	0,391-0,083	0,510-0,731	**	0,447-0,673	0,455-0,681	0,327-0,816
VPP	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	66,70%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	75,0%	100,0%
VPN	98,7%	94,7%	97,4%	97,4%	94,8%	92,6%	94,8%	93,6%	96,2%	94,0%	91,1%	79,0%	92,4%

VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo; ** não foi possível análise pela Curva ROC.

Figura 18: Curva ROC da metodologia PCR-RFLP para os tipos de HPVs 16, 18, 51 e 58. Pode ser observada a sensibilidade e a especificidade para os quatro tipos. As melhores sensibilidade e especificidade foram do HPV 58, seguidas pelo 18, 16 e 51.



7 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram uma alta prevalência da positividade de HPV (24,6%), CT (11,1%) e coinfeção HPV/CT (4,6%) na amostra estudada. As prevalências observadas neste estudo estão de acordo com os dados da literatura que demonstram o amplo intervalo da prevalência e incidência das infecções por HPV, CT e a coinfeção HPV/CT, de acordo com o método de diagnóstico empregado e a população estudada (CASTELLSAGUE; BOSCH; MUNOZ, 2002; CHRISTIAN et al., 2005; FRANCO; STEBEN, 2007; LAN et al., 2008).

Em geral, os países em desenvolvimento têm maior prevalência da infecção por CT (FRANCESCHI, et al., 2007). Essas nações têm valores de prevalência que variam de 5-22% para CT e podem chegar a valores de até 41% entre adolescente do sexo feminino (WHO, 2011; DELUCA et al., 2011). Por outro lado, em países desenvolvidos, a prevalência para CT tem níveis que variam de menos de 2% a 8-10% na população em geral e de menos de 5% a 20% em adolescentes do sexo feminino (WHO, 2011; FERDÁNDEZ-BENÍTEZ et al., 2013).

A avaliação por meta-análise de estudos epidemiológicos realizados na Espanha com mulheres sexualmente ativas e assintomáticas encontrou uma prevalência que variou de 3,1-10% (FERNÁNDEZ-BENÍTEZA et al., 2013). Outro estudo de meta-análise, que reuniu setenta e seis estudos de prevalência da CT na Austrália, demonstrou uma prevalência de 10,2% para mulheres (LEWIS et al., 2012). No Brasil, em geral, as prevalências variam de 12,2% a 20,7%. Em um estudo realizado em Porto Alegre, também com mulheres assintomáticas, constatou-se uma prevalência de 12,2% (RAMOS et al., 2003). Já em Manaus, Santos e colaboradores (2003) estudaram 121 mulheres, encontrando a prevalência da infecção pela CT de 20,7%.

A prevalência da infecção por CT é maior em adultos jovens heterossexuais com menos de 25 anos de idade (HOCKING et al.; 2013). Em dois estudos realizados na Austrália, um em mulheres com indicação clínica (BOWDEN et al., 2008) e outro no rastreamento de mulheres em geral (HOCKING et al.; 2006), foi observada uma maior prevalência em mulheres com menos de 25 anos de idade em comparação com mulheres mais velhas. Entretanto, um terceiro estudo que mensurou a prevalência em ambos os sexos entre mochileiros internacionais, relatou uma prevalência maior em mulheres com idade

superior a 25 anos em comparação com mulheres mais jovens; contudo, a tendência inverteu-se para os homens (DAVIES et al., 2011; MARKLE; CONTI, 2013).

Na amostra estudada, a prevalência da infecção pela CT e coinfeção HPV/CT teve um comportamento decrescente com o aumento da idade até os 54 anos. Entretanto, ao contrário da maioria dos estudos, um novo pico foi observado para ambas às infecções, CT e coinfeção HPV/CT, em mulheres com idade superior a 55 anos, porém em menor proporção para a coinfeção. Por se tratar de um estudo transversal, não é possível afirmar se a prevalência da CT e da coinfeção HPV/CT em mulheres acima de 55 anos deve-se a persistência de uma infecção adquirida anteriormente ou a uma nova infecção.

Diversos fatores de risco são apontados em relação à infecção por CT como idade inferior a 26 anos, baixo nível socioeconômico, o uso de contraceptivos orais, idade da primeira relação sexual e novos ou múltiplos parceiros sexuais. Na amostra estudada, observou-se que a frequência da infecção foi maior em mulheres que relataram dois ou mais parceiros ao longo da vida quando comparada às mulheres que tiveram um parceiro ($p=0,048$). Isso pode ser explicado pelo fato de que, múltiplos parceiros podem aumentar a probabilidade de encontrar um patógeno sexualmente transmissível por meio do aumento da chance de escolher um parceiro que tenha a infecção (VRANIC, 2012).

Apesar de não ter sido encontrada associação estatisticamente significativa entre a infecção pela CT e a idade, observou-se que a prevalência da infecção foi maior na faixa etária de mulheres mais jovens, com idade inferior ou igual a 24 anos. Uma possível hipótese é que mulheres mais jovens são mais predispostas à infecção por CT, pois a CT infecta células colunares do colo do útero e, em mulheres mais jovens, estas células localizam-se principalmente na ectocérvix (ectopia), local onde aumenta a chance de entrarem em contato com o sêmen que pode estar contaminado com CT. Ao contrário, em mulheres mais velhas as células colunares estão localizadas na parte mais elevada no canal cervical, diminuindo as chances de infecção (JACOBSON et al., 2000).

Embora na amostra estudada, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o uso de contraceptivos orais e a infecção por CT, estudiosos defendem a hipótese que o uso de contraceptivos orais aparentemente também podem aumentar a ectopia cervical, favorecendo a infecção por esta bactéria (JACOBSON et al.,

2000). As diferenças na prevalência da infecção entre adolescentes e adultos também são frequentemente atribuídas às diferenças nos comportamentos sexuais desses dois grupos. Essa hipótese foi comprovada em estudos de prevalência nos Estados Unidos e Canadá, onde foram observadas as maiores taxas de incidência da infecção por CT em adolescentes e adultos jovens (VRANIC, 2012). A prevalência da coinfeção HPV/CT foi de 4,6% e observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e pela CT. Barros e colaboradores (2012) observaram uma associação significativa entre a soropositividade para CT e o diagnóstico de neoplasias intraepiteliais cervicais em mulheres positivas para o HPV (BARROS et al., 2012). Outro estudo, que objetivou avaliar a detecção do HPV após aparente resolução da infecção com a positividade para CT, observou que indivíduos positivos para CT tinham três vezes mais chances de ter HPV detectado novamente do que indivíduos negativos (SHEW et al., 2013).

Devido à grande importância de doenças causadas pela CT e aos riscos associados à sua infecção, o CDC e ASHA-EUA preconizam o rastreamento de rotina para CT em gestantes e em todas as mulheres sexualmente ativas entre 15 e 25 anos de idade (CDC 2006). Porém, ainda poucos países realizam rotineiramente o rastreamento da infecção por CT. Observa-se que países que adotaram o rastreio de rotina obtiveram resultados satisfatórios e demonstram que esse rastreamento pode ser custo-efetivo, mesmo quando as prevalências da infecção são baixas (HONEY et al., 2002; NCSSG 2006; AHRQ, 2007; C-BENÍTEZA et al., 2013).

No presente estudo, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença da coinfeção HPV/CT e a variável idade e o uso de anticoncepcional oral. Observou-se que a frequência de coinfeção foi maior em mulheres com idade inferior ou igual a 30 anos e em mulheres que fazem uso de anticoncepcional oral, embora não tenha sido possível estimar uma razão de chance estatisticamente significativa entre a coinfeção e estas variáveis. Estes achados corroboram diversos estudos que comprovam que a prevalência tanto da infecção pelo HPV quanto da infecção pela CT ocorrem mais em mulheres jovens, com idade inferior a 30 anos no caso do HPV, e inferior a 25 anos no caso da CT. Para ambas as infecções, estas diferenças são frequentemente atribuídas ao comportamento sexual desses grupos etários (TROTIER; FRANCO, 2006; VRANIC, 2012).

Para o HPV também se postula que mulheres mais jovens são mais predispostas à infecção porque durante a puberdade ocorre um processo denominado de metaplasia escamosa (processo de transformação gradual do epitélio colunar em epitélio escamoso na zona de transformação). Durante esse processo, células do colo uterino estão em intenso processo proliferativo e dessa forma, podem favorecer a replicação do HPV, tornando-se suscetíveis às alterações induzidas por esse vírus (MOSCICKI, 2005).

A prevalência da positividade do HPV apresenta grande variação conforme a região geográfica estudada (2,0% a 44,0%) (FRANCO et al. 1999; FRANCO; STEBEN, 2007; BOSCH et al., 2008). Isso se deve a vários fatores que incluem: o desenho do estudo, a sensibilidade do teste empregado para detecção viral, os tipos virais pesquisados e os padrões sexuais socialmente aceitos. Além disso, deve-se considerar a efetividade dos programas de rastreamento do câncer cervical no diagnóstico e tratamento das mulheres com lesões HPV induzidas (CASTLE et al., 2005; RAMA et al., 2010), visto que os países subdesenvolvidos possuem as maiores taxas (BOSCH et al., 2008). Um estudo de meta-análise sobre a prevalência mundial de HPV mostrou uma taxa de infecção global variando de 10,4% a 12,9% para a América Latina (DE SANJOSE et al., 2007).

No presente estudo, a prevalência da positividade para o HPV foi de 24,6% e está de acordo com estudos brasileiros que demonstram uma ampla faixa de prevalência (14,6% a 56,0%) (MAGALHÃES et al., 2008; LIPPMAN et al., 2010). No Rio de Janeiro, a prevalência varia de 17,8% a 35,0%, em São Paulo varia de 13,8% a 48,0%, (FRANCO et al., 1999; MOYSÉS et al., 2008), de 14,6% a 29,1% na Amazônia (PINTO; FUZII; QUARESMA et al., 2011; ROCHA et al., 2013) de 21% a 38,3% em Florianópolis (FEDRIZZI; SCHLUP; MENEZES, 2008; MARTINS et al., 2012).

De acordo com o esperado, a maior prevalência da infecção pelo HPV neste estudo foi em mulheres com menos de 30 anos. Observou-se que mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos têm 1,9 vezes mais chance de ter HPV do que mulheres com idade superior a 30 anos, $RC = 1,971$ e $IC\ 95\% (1,095-3,547)$, $p = 0,024$. Entretanto, é importante destacar que a prevalência permaneceu elevada mesmo em idades mais avançadas, apesar da curva ter um comportamento decrescente com o aumento da idade. A elevada prevalência para o grupo de mulheres mais jovens pode significar infecção transitória, entretanto, para as mulheres com mais de 30 anos, a positividade pode

indicar persistência da infecção, o que demandaria um segmento mais minucioso e frequente (RAMA et al., 2008).

A infecção pelo HPV é mais frequente em mulheres jovens, sexualmente ativas, com um pico da infecção em mulheres com idade inferior a 30 anos. A partir dos 30 anos ocorre uma acentuada diminuição na incidência da infecção em virtude do tipo de atividade sexual. Outra hipótese para esse padrão observado é o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa pelos indivíduos infectados, a qual poderia prevenir a aquisição de uma infecção futura (TROTIER; FRANCO, 2006). Entretanto, sabe-se que a maioria dessas infecções é transitória, visto que a prevalência do câncer cervical é maior em mulheres acima dos 35 anos, atingindo o pico de incidência na faixa etária de 45 a 49 anos, principalmente porque o tempo médio entre a infecção inicial e a manifestação do câncer cervical é de pelo menos 15 anos. (MOSCICKI, 2005; CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006, NADAL; MANZIONE, 2006).

Embora o fator central na etiologia para o desenvolvimento do câncer do colo do útero seja a infecção persistente por tipos de HPV oncogênicos (ZUR HAUSEN, 2009), outros fatores de risco estão relacionados à aquisição sexual do HPV, assim como à disfunção imunológica e à exposição a fatores mutagênicos e hormonais. Os mais notáveis riscos são a idade precoce de atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, exposição a outras DSTs, uso de anticoncepcivo oral, além do tabagismo, infecção pelo HIV e terapia com agentes imunossupressores (CHAUHAN et al., 2009; IBEANU, 2011).

Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a positividade para o HPV e o início precoce da atividade sexual. Mulheres que tiveram sua primeira relação sexual com idade inferior ou igual a 18 anos têm 2,2 vezes mais chance de ter HPV do que mulheres que tiveram sua primeira relação sexual após os 18 anos de idade $RC=2,250$ e $IC\ 95\% (1,0062-4,764)$, $p=0,034$, possivelmente, positividade causada pelo aumento do tempo de exposição ao vírus (CASTELLSAGUE; BOSCH; MUNOZ, 2002; NAUD et al.; 2006; FEDRIZZI; SCHLUP; MENEZES, 2008).

Embora tenha sido encontrada associação estatisticamente significativa entre a positividade do HPV e o uso de contraceptivos orais, não foi possível estimar uma razão de chance estatisticamente significativa para esse dado. Existem muitas controvérsias entre os estudiosos em relação à associação da infecção pelo HPV e o uso de

anticoncepcional. Acredita-se que os esteroides interferem na atividade viral estimulando a atividade oncogênica do HPV (GELLER et al., 2008). Castellsagué e Munoz (2003) observaram aumento do risco de câncer de colo do útero com o uso prolongado de anticoncepcionais orais, ressaltando que este risco é duas vezes maior em mulheres que fazem uso desses medicamentos por mais de 10 anos. Entretanto, em outros estudos foi observado o contrário, mulheres que faziam uso de contraceptivos orais apresentaram menor risco de desenvolver câncer cervical. Fedrizzi e colaboradores (2008) também não observaram relação entre o uso desses medicamentos e o aumento do risco da infecção pelo HPV.

Existem diversos relatos que relacionam o número de parceiros sexuais com os riscos da infecção pelo HPV (KORNYA et al., 2002; BASEMAN; KOUTSKY, 2005; KHAN et al., 2005). No presente estudo, constatou-se que mulheres que se relacionaram com dois ou mais parceiros ao longo da vida têm 1,7 vezes mais chance de ter HPV do que mulheres que tiveram somente um parceiro ao longo da vida, $RC= 1,78$ e $IC\ 95\% (1,0004-3,155)$, $p= 0,048$. Dado que talvez se deva ao prolongamento do tempo de exposição ao vírus (CASTELLSAGUE; BOSCH; MUNOZ, 2002; NAUD et al.; 2006). Um estudo desenvolvido por Ho e colaboradores (1998) demonstrou que o aumento do número de parceiros sexuais está fortemente relacionado ao risco de infecção com HPVs oncogênicos.

Mesmo que neste estudo não tenham sido abordados fatores socioeconômicos, é importante destacar que o escasso acesso a serviços de rastreio do câncer do colo do útero, bem como o não cumprimento da rotina do rastreio para o câncer cervical são fatores de risco sociais relacionados aos baixos níveis socioeconômico e de escolaridade que são frequentemente observados entre afroamericanos, indianos e mulheres hispânicas quando comparadas às caucasianas norte americanas (IBEANU, 2011).

Estudos epidemiológicos são de grande valia para determinar os tipos de HPVs circulantes em diferentes localidades, considerando-se as diferenças relacionadas ao impacto no manejo clínico que os tipos de HPVs de alto e baixo risco determinam. Este conhecimento também se faz importante na tentativa de se prever o impacto da eficácia das vacinas anti-HPV em uma determinada população (ROCHA et al., 2013). Neste estudo, foram identificados 31 diferentes genótipos de HPV, sendo que o 16 foi o mais prevalente, corroborando, desta forma, com as estatísticas mundiais, nacionais e locais (SCHLUP; MENEZES,

2008; LIPPIMAN et al., 2010; IBEANU, 2011; FEDRIZZI; MARTINS et al., 2012).

A maior parte das pesquisas de frequência dos tipos de HPV incluídas as realizadas no Brasil é desenvolvida em populações com câncer cervical ou citologia anormal. Estudos de meta-análises realizados pelo IARC demonstram que, fora algumas exceções, os padrões mundiais correspondem à prevalência encontrada neste estudo. Um estudo de meta-análise de prevalência dos tipos de HPV em câncer cervical e HSIL demonstrou que, na América do Sul, os dez tipos de HPVs mais comuns em mulheres com câncer cervical foram: 16, 18, 31, 45, 52, 33, 35, 39, 58 e 59, e em mulheres com HSIL foram os tipos 16, 58, 18, 51, 6, 31, 33, 11, 45 e 35 (SMITH et al., 2007). Todos esses tipos foram encontrados no presente estudo.

Munoz e colaboradores (2004) avaliaram mulheres de 25 países com câncer do colo do útero e encontraram 30 tipos de HPVs diferentes, dos quais os tipos 16, 18, 31, 45, 33, 35, 52 e 58 foram os oito mais comuns na Europa Central e na América do Sul. O tipo 53, apesar de ser classificado com oncogênico ou potencialmente oncogênico por diversos autores (MUNOZ et al., 2004; DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, et al., 2010), parece não estar associado ao câncer, contudo, é encontrado em lesões intraepiteliais de alto e baixo grau (LSIL e HSIL) (CLIFFORD et al., 2006). O HPV 53 foi classificado como baixo risco em um estudo realizado em cinco cidades brasileiras e a detecção desse tipo viral foi comum neste estudo e em outros com amostras de citologia normal (DE SANJOSE et al., 2007; LIPPIMAN et al., 2010; ARGYRI et al., 2013).

O HPV 16 e o 18 são considerados os tipos mais oncogênicos. Eles têm sido relatados como os mais prevalentes em mulheres assintomáticas e sintomáticas e estão associados à cerca de 50-70% e 20-30% respectivamente dos cânceres cervicais invasivos diagnosticados no mundo (IBEANU, 2011). Existem evidências de que os tipos de HPV 31 e 39 são mais prevalentes do que o HPV 18 nas Américas do Sul e Central do que em outros continentes, diminuindo assim nestas localidades a fração estimada de câncer cervical positivo para HPV 16 e 18 (MUNOZ et al., 2003; CLIFFORD et al., 2006; LIPPIMAN et al., 2010). Ainda que diversos estudos comprovem que o HPV 18 é o segundo tipo de HPV oncogênico mais prevalente (BOSCH, de SANJOSE, IBEANU, 2011), no presente estudo, ele foi o décimo mais prevalente.

Outros tipos de HPVs, como 31, 39, 53, 56 e 68, estão entre os mais frequentes no presente estudo, e esses tipos virais têm sido associados ao desenvolvimento do câncer, porém com menor impacto (ZUR HAUSEN, 2002; DE VILLIERS et al., 2003; EINSTEIN et al., 2009; ZUR HAUSEN, 2009; LIZANO; BERUMEM; GARCIA-CARRANCA, 2009; CHAUHAN et al., 2009). Resultados semelhantes foram encontrados por Argyri e colaboradores (2013) em um estudo que utilizou a metodologia de *microarray* (Papillocheck[®]), no qual o HPV 16 foi o mais prevalente e os tipos 31, 51, 53 e 56 estavam entre os mais frequentes. Mulheres infectadas com tipos de HPV de alto risco têm maiores taxas de progressão para neoplasias intraepiteliais cervicais em comparação com mulheres infectadas com tipos de HPV de baixo risco (CASTRO et al., 2011; ROCHA et al., 2013).

No presente trabalho, na curva de prevalência de HPVs de alto risco de acordo com a faixa etária, observa-se um pico em mulheres com idade inferior ou igual a 24 anos, e um pico sutilmente maior em mulheres de 25-34 anos, o qual posteriormente decresce com o aumento da idade. Dados semelhantes foram observados por Argyri e colaboradores (2013), que encontraram um pico na faixa etária de 14-25 anos, corroborando com dados de outros estudos europeus (DE SANJOSE, 2006; MANHART et al., 2006). Mulheres mais jovens são mais predispostas a desenvolver a infecção pelo HPV, pois na zona de transformação do colo do útero, o epitélio escamoso sofre sucessivas transformações em epitélio glandular e vice-versa, favorecendo a infecção pelo HPV (ETHIER et al., 2003). Estas mulheres também são menos propensas a desenvolverem imunidade ao HPV dada a sua exposição recente para o vírus (ARGYRI et al., 2013).

Em relação aos tipos de HPV de baixo risco, os mais prevalentes neste estudo foram o 44/55, 43, 62, 6, 11 e 89, concordando com estudos que demonstram que os tipos virais 6 e 11 estão entre os mais prevalentes (LIPPIMAN et al., 2010; ARGYRI et al., 2013).

A citologia foi a variável que apresentou associação mais forte com o HPV, pois este estudo constatou que mulheres com citologia normal têm 99,7% menos chances de ter infecção pelo HPV do que mulheres com alterações citológicas como LSIL ou ASCUS, $RC = 0,028$ e IC 95% (0,003-0,226), $p = 0,001$. Como esperado, a positividade do HPV foi em geral maior em anormalidades citológicas, 100% para mulheres com citologia alterada (LSIL e ASCUS) e de 22,2% para mulheres com citologia normal. A mesma tendência foi observada em um estudo europeu, no qual a prevalência aumentou à medida que as

lesões progrediram para graus mais elevados, citologia normal (15,7%), ASCUS (34,0%), LSIL (74,4%) e HSIL (98,2%) (ARGYRI et al., 2013).

Estudos epidemiológicos indicam que tipos de HPVs que infectam o trato anogenital são observados em pacientes sintomáticos e assintomáticos e que a maioria das infecções resolve-se espontaneamente. No âmbito clínico, não é atípico uma mesma paciente apresentar infecção por múltiplos tipos de HPV. Infecções genitais múltiplas, simultâneas ou sequenciais podem ocorrer, principalmente em adolescentes do sexo feminino, sendo, muitas vezes, difícil de distinguir entre infecções persistentes e novas infecções por outros tipos virais (HO et al.; 1998; IBEANU, 2011).

A prevalência, neste estudo, das infecções múltiplas por HPV foi de 67,5% e na maioria delas pelo menos dois tipos oncogênicos estavam presentes. Constatou-se também que em amostras poli-infectadas, quanto maior o número de tipos virais, maior o número de tipos oncogênicos, o que é consistente com outros estudos epidemiológicos (DE SANJOSE et al., 2010; ARGYRI et al., 2013).

Mesmo que uma infecção persistente com um tipo de HPV oncogênico seja causa necessária para a carcinogênese, ressalta-se ainda que vários outros fatores e eventos moleculares possam contribuir para a transformação de células epiteliais do colo do útero em células malignas. Estudos clínicos demonstraram que tais transformações estão associadas com a integração do genoma viral e a instabilidade genética das células epiteliais que ocorrem ao longo do período de infecção pelo HPV. No presente estudo, foi observada uma alta prevalência de infecções múltiplas por diferentes tipos de HPV, o que pode, em alguns casos, estar associada à imunossupressão observada em pessoas vivendo com HIV/AIDS, ou submetidas a terapias imunossupressoras, que aumentam a probabilidade de persistência de uma infecção por HPV oncogênico e suas sequelas (ACS, 2008; LEHOUX; D'ABRAMO; ARCHAMBAULT et al., 2009). Entretanto, a coinfeção pelo HIV e outras causas de imunossupressão não foram avaliadas neste estudo.

Na infecção pelo HPV, ainda não está totalmente compreendida a forma como alguns cofatores favorecem a persistência do vírus no epitélio e contribuem para o desenvolvimento da doença (DRAIN et al., 2002; ALMONTE et al., 2008; TAVARES et al., 2012). Estudos demonstram uma associação entre HPV e CT no desenvolvimento do carcinoma cervical, sugerindo que a infecção com esta bactéria é um fator de predisposição para a posterior infecção pelo HPV, ou vice-

versa, devido à forma semelhante de transmissão sexual (KOSKELA et al.; 2000; BARROS et al., 2012; SILVA et al., 2013).

A detecção do DNA de HPV e CT por PCR somente indica uma infecção aguda ou crônica no caso da CT e uma infecção transitória ou persistente no caso do HPV. Portanto, neste estudo, não foi possível determinar qual a primeira infecção, se HPV ou CT. Entretanto, observou-se que em casos positivos para CT existe um aumento do risco de infecção pelo HPV de 2,46 vezes (RC= 2,462 e IC 95% (1,201-5,046), $p= 0,014$). Ainda que o intervalo de confiança seja relativamente grande em relação à associação HPV/CT, os resultados encontrados podem sugerir uma possível interação entre os agentes sexualmente transmissíveis, como já relatados em outros estudos (KOSKELA et al.; 2000; WALLIN et al., 2002; FELICE et al., 2005; BARROS et al., 2012; SILVA et al., 2013). Entretanto, no presente trabalho, não foram estudados os mecanismo da interação HPV e CT. Diversos estudos sugerem que a infecção por CT está associada à persistência de tipos de HPV oncogênicos (SAMOFF et al., 2005; SILINS et al., 2005), entretanto, não foi encontrada associação estatisticamente significativa na amostra estudada entre tipos de HPVs de alto risco e a infecção por CT.

A CT pode atuar como um cofator no desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais cervicais, promovendo a penetração do HPV e danos na mucosa e, desta forma, facilitando o progresso de lesões cervicais e interferindo na resposta imunológica (SIMONETT et al. 2012; SAMOFF et al., 2005; SILINS et al., 2005). Além disso, a CT pode induzir efeitos locais sobre as células cérvico-vaginais, tais como: hipertrofia, metaplasia e inflamação (MARKOWSKA et al., 1999; SMITH et al., 2000; SILVA et al., 2013); bem como evadir-se do sistema imune (SIMONETTI et al., 2012; SILVA et al., 2013). Esses mecanismos podem facilitar a reinfecção ou persistência da infecção pelo HPV (SILINS et al., 2005). Contudo, ainda não está claro em que estágio do processo da carcinogênese cervical a CT possa atuar de forma sinérgica ao HPV (SILVA et al., 2013).

Pesquisadores defendem que a associação entre esses dois agentes parece estar mais relacionada a uma potencialização mútua do que ao fato de compartilharem uma rota comum de transmissão (VERHOEVEN et al., 2004, DELUCA et al., 2011). Na verdade, existem informações controversas e discordantes sobre essa interação HPV e CT e ainda não há consenso sobre o papel da CT na história natural da infecção pelo HPV (DELUCA et al., 2011).

O presente estudo mostrou elevadas prevalências de HPV e CT em mulheres que buscaram exames para prevenção de câncer do colo uterino, e corrobora com o argumento de que se deve promover o rastreamento concomitante do HPV e da CT, e, desta forma, influir diretamente sobre os efeitos tardios dessas duas infecções com medidas preventivas, curativas e educacionais. Reduzir a incidência de CT pelo rastreamento também poderia permitir uma diminuição na incidência da infecção persistente por HPV (WOODMAN et al., 2001; RONCO et al., 2010; SILVA et al., 2013).

Em virtude da importância do acompanhamento ou tratamento das mulheres infectadas pelo HPV e tratamento das mulheres infectadas por CT cresce a importância de métodos diagnósticos sensíveis, específicos e rápidos. No presente trabalho, foram estudadas técnicas moleculares de diagnóstico e de tipagem no caso do HPV. Dentre essas técnicas, as infecções por HPV e CT foram triadas pela PCR multiplex, enquanto os tipos virais de HPV foram identificados por PCR-RFLP, sequenciamento e *microarray* e neste último caso, com o objetivo de se comparar o método comercial referência com o método *in house* de baixo custo.

Os mais importantes avanços no diagnóstico e rastreamento da infecção pela CT e pelo HPV foi o desenvolvimento de métodos baseados na amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs). Os NAATs são mais sensíveis se comparados aos métodos tradicionais de diagnóstico. A possibilidade da utilização de amostras provenientes de coletas não invasivas com *swabs* vaginais (mulheres), uretrais (homens) e urina (ambos) se constitui uma das maiores vantagens do uso destas tecnologias, pois permite sua utilização do rastreamento de indivíduos assintomáticos bem como uma maior adesão por parte da população, visto que a coleta pode ser realizada pelo próprio indivíduo.

A PCR é uma ferramenta útil para o rastreamento das infecções causadas pelo HPV e pela CT, principalmente em indivíduos assintomáticos, visto que a mesma é capaz de detectar pequenas quantidades de ácidos nucleicos suficientes para um diagnóstico preciso. A PCR-multiplex desenvolvida neste estudo mostrou-se útil no rastreamento concomitante do HPV e da CT e corrobora com dados de outros estudos que demonstraram que a PCR-multiplex apresenta desempenho igual a PCR monoplex (LEE et al., 2012; ZAULI, de MENESES; de OLIVEIRA, 2013).

Lee e colaboradores (2012) avaliaram o desempenho de uma PCR-multiplex direcionada a seis diferentes patógenos causadores de DSTs, dentre eles, a *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae*, em relação a PCR monoplex. A concordância foi de 100% tanto para sensibilidade quanto para especificidade. Os resultados da PCR-multiplex para *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae* também foram comparados com o BD Probe Tec. e eles foram 99,7% concordantes para *Chlamydia trachomatis* e 100% para *Neisseria gonorrhoeae*.

A PCR monoplex desenvolvida neste estudo para a detecção de CT demonstrou uma sensibilidade analítica de 48,75 pg/ μ L de DNA plasmidial de CT. Partindo-se do princípio que a PCR multiplex tem desempenho equivalente a PCR monoplex, a PCR multiplex desenvolvida neste estudo torna-se útil no rastreamento concomitante do HPV e CT e com uma sensibilidade analítica considerável no caso da CT. Embora não tenha sido estabelecida a sensibilidade analítica para a PCR monoplex para o HPV, observou-se que as 80 amostras identificadas como HPV positivas pela PCR multiplex foram igualmente detectadas pela PCR monoplex. Os ensaios de PCR multiplex utilizando múltiplos iniciadores em reações de PCR são inovadores e oferecem benefícios significativos no custo, tempo e acurácia do diagnóstico (ZAULI, de MENESES; de OLIVEIRA, 2013).

A metodologia de PCR-RFLP para o diagnóstico dos tipos virais do HPV foi inicialmente descrita para uso com os iniciadores MY0911. Entretanto, análises de bioinformática sugeriram que o protótipo descrito por Nobre e colaboradores (2008) também poderia incorporar o sistema PGMY0911, um sistema que consiste em um conjunto de cinco oligonucleotídeos iniciadores *reverse* (*pool* de *primers* PGMY11) e um conjunto de 13 oligonucleotídeos iniciadores *forward* (*pool* de *primers* PGMY09) que se ligam a mesma região dos iniciadores MY09 e MY11 respectivamente. Este sistema aumenta a eficiência da amplificação de alguns tipos de HPV e demonstra ser mais sensível que os iniciadores MY09/11 (COUPLÉE et al., 2002; GIOVANELLI et al., 2004).

No presente estudo, o PCR-RFLP identificou uma prevalência de HPV de 26,4% e foi capaz de identificar pelo menos um tipo viral em 70 (87,50%) amostras dentre as 80 positivas. Resultados semelhantes utilizando a mesma metodologia foram encontrados por Coser e colaboradores (2011), que obtiveram uma prevalência 28,9% em mulheres do estado do Rio Grande do Sul. Os pesquisadores foram

capazes de identificar tipos virais em todas as amostras positivas. Entretanto, quando se avalia os tipos virais identificados, o presente estudo determinou quase duas vezes mais genótipos virais (28 genótipos) do que Coser e colaboradores (18 genótipos).

O Papillocheck[®] detectou genótipos de HPV em 72 (90,0%) amostras das 80 positivas para o HPV. Todas as oito amostras negativas neste ensaio foram genotipadas pelo RFLP e sequenciamento, revelando genótipos de HPV que o Papillocheck[®] não é capaz de identificar (HPV 61, 74, 83, 84 e 89). Kónya e colaboradores (2000) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram o desempenho do PCR-RFLP com o ensaio de Captura Híbrida. O PCR-RFLP detectou infecções individuais com HPV 53 (duas amostras), HPV 58 (duas amostras), HPV 66 (três amostras), HPV CP8304, e HPV MM4, posteriormente confirmadas pelo sequenciamento quando a Captura Híbrida não foi sensível suficiente para identificar os tipos virais 53 e 58. Os demais tipos não estão disponíveis no coquetel de sondas da Captura Híbrida (KÓNYA et al., 2000).

Em relação a infecções por mais de um tipo de HPV, o PCR-RFLP identificou 20 coinfeções por dois diferentes tipos virais, e destas, 45% (9/20) foram infecções por dois tipos de HPV de alto risco e 25% (5/20) foram infecções por HPV de alto risco e outro possivelmente carcinogênico, 15% (3/20) HPV de alto risco associado a outro de baixo risco. Entretanto, o sequenciamento identificou uma coinfeção (HPV16/HPV45) e 75 monoinfeções nas 80 amostras analisadas. Neste contexto, o Papillocheck[®] teve o melhor desempenho, identificando 50 amostras (62,5%) com mais de um tipo de HPV e 30 (37,5%) com um único tipo.

Diante dos resultados apresentados, pode-se inferir que a metodologia PCR-RFLP tem um bom desempenho para a identificação concomitante de até dois tipos de HPV em uma mesma amostra. O sequenciamento mostrou-se uma excelente ferramenta para a identificação de infecções por um único tipo viral, enquanto o Papillocheck[®] foi o método de escolha para amostras polinfetadas.

Resultados semelhantes foram observados por Gasperov e colaboradores (2008) em um estudo que comparou quatro metodologias diferentes para a detecção e genotipagem do HPV por PCR, PCR-RFLP, hibridização reversa (INNO-LiPA) e sequenciamento. Quando os pesquisadores compararam o PCR-RFLP com o INNO-LiPA, ambos

mostraram frequências bastante semelhantes para a detecção da infecção por um único tipo viral. Entretanto, o INNO-LiPA detectou quase duas vezes mais infecções múltiplas do que o PCR-RFLP. No presente estudo, também foi observado que o Papillocheck® detectou 2,5 vezes mais infecções múltiplas do que o PCR-RFLP.

Por outro lado, Kaneshima e colaboradores (2001), utilizando-se do protótipo descrito por Bernard e colaboradores (1994), no qual foi registrado o uso de sete enzimas de restrição para a genotipagem do HPV, encontraram resultados satisfatórios em relação à sensibilidade e reprodutibilidade para a infecção concomitante de até quatro tipos de HPV na mesma amostra.

A genotipagem do HPV por sequenciamento tem seu uso limitado a infecções múltiplas, uma vez que as sequências que representam os tipos de HPV em menor quantidade podem não ser detectadas e, desta forma, se encorrem no erro de subestimar a prevalência de infecções com múltiplos genótipos de HPV em estudos epidemiológicos e de acompanhamento (KLETER et al., 1999; MOLIJN et al., 2005). Gasperov e colaboradores (2008) também demonstraram que a metodologia de sequenciamento é um bom método no caso de monoinfecções, mas não se aplica em casos de infecções múltiplas e nem na prática clínica (GASPEROV et al., 2008).

Os achados do presente trabalho corroboram os dados de outros estudos, que demonstram que a metodologia de PCR-RFLP é menos eficiente quando vários genótipos do HPV estão presentes na mesma amostra (NOBRE et al.; 2008; GASPEROV et al., 2008). No caso de infecções múltiplas, os padrões de PCR-RFLP são frequentemente muito complexos e a interpretação dos fragmentos gerados pode não permitir a utilização do algoritmo na identificação dos genótipos envolvidos na infecção, mesmo utilizando-se as sete enzimas descritas por Bernard e colaboradores (1994) (NOBRE et al.; 2008; GASPEROV et al., 2008).

A eficácia desta metodologia, entretanto, pode ser melhorada com a incorporação de uma estratégia multi-metodológica. O ensaio de PCR-RFLP pode ser utilizado como um método de genotipagem de primeira linha para determinar o genótipo de HPV em infecções simples (ou mesmo discriminar entre infecções simples ou múltiplas), enquanto que a análise por uma metodologia com maior poder discriminatório, por exemplo, o *microarray* pode ser utilizado como método complementar, quando os padrões de PCR-RFLP não permitirem a

identificação do tipo viral presente na infecção por HPV (GASPEROV et al., 2008).

A metodologia PCR-RFLP baseada no polimorfismo dos fragmentos gerados por quatro enzimas de restrição (*Pst*I, *Hae* III, *Dde*I e *Rsa*I) utilizadas no presente estudo é capaz de discriminar todos os 43 tipos de HPV que infectam a mucosa anogenital em infecções por um único tipo viral ou, até mesmo, de detectar as infecções múltiplas em alguns casos. Este ensaio fornece informações complementares aos métodos disponíveis no mercado, tais como, o observado neste estudo, ou seja, a detecção de oito genótipos de HPV não determinados pelo Papillocheck[®]. Informações essas que podem ser financeiramente vantajosas, principalmente quando os recursos financeiros são escassos (NOBRE et al., 2008).

No total das amostras analisadas, as três metodologias foram concordantes em relação à genotipagem de pelo menos um tipo de HPV em 71,25% (57/80) das amostras. A genotipagem de 92,50% (74/80) das amostras foi concordante em pelo menos duas metodologias e 7,5% (7/80) foram discordantes nas três metodologias. Observou-se que uma amostra (n° 320-Tabela 9) foi positiva para o HPV 68 nas metodologias de PCR-RFLP e sequenciamento, mas positiva somente para HPV 39 no *microarray*. Neste caso é possível que haja infecção por dois tipos virais e o *microarray* pode não ter identificado o tipo viral 68, enquanto o sequenciamento e o PCR-RFLP detectaram apenas esse tipo.

Dentre as sete amostras discordantes, duas (n° 57 e 667- Tabela 19) foram inconclusivas no PCR-RFLP, HPV 62 no sequenciamento e HPV 56 no Papillocheck[®], duas (n° 387 e 474- Tabela 19) foram positivas para HPV 61 no sequenciamento. A primeira foi positiva para HPV 16 e 66 e a segunda foi positiva para HPV 43, 45, 59 e 68 no Papillocheck[®]. Estes resultados são aceitáveis visto que infecções por mais de um tipo de HPV são frequentes, e os tipos virais detectados pelo sequenciamento (HPV 61 e 62) não são detectados pelo Papillocheck[®]. Postula-se também que o sequenciamento em infecções por mais de um tipo viral é capaz de identificar o tipo viral mais predominante na infecção (KLETER et al., 1999; MOLIJN et al., 2005). Por fim, uma amostra foi inconclusiva no RFLP, HPV 89 no sequenciamento e negativa no Papillocheck[®]. Uma possível explicação para o resultado do PCR-RFLP ter sido inconclusivo é que esta amostra pode conter além do HPV 89 outros tipos virais não detectados pelo Papillocheck[®].

O grau de concordância interensaio foi calculado pelo teste Kappa com intervalo de confiança de 95% para os resultados de genotipagem do HPV pelo PCR-RFLP e sequenciamento, PCR-RFLP e Papillocheck[®] e PCR-RFLP e os resultados conjuntos do Sequenciamento e do Papillocheck[®]. Quando o PCR-RFLP e o sequenciamento foram avaliados, observou-se concordância perfeita para os tipos de HPVs 32, 33, 70, 74, 83 e 84 (K=1), significando que estes tipos virais foram igualmente detectados em ambos os testes. A concordância foi muito boa para os tipos 16 e 51, boa para os tipos virais 18, 53, 55, 58, 59, 66, 68, 73, 61 e 89, moderada para os tipos 52 e 62, razoável para os tipos 6, 11, 35, 44 e 45 e pobre para os tipos 31 e 39. A identificação do tipo viral de HPV pelo PCR-RFLP demonstrou que mesmo que o PCR-RFLP não tenha tido um bom desempenho para os tipos virais 6, 11, 35, 44, 45, 31 e 39 o desempenho da metodologia foi bom a muito bom para uma gama de tipos virais relacionados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e ao câncer, e que desta forma poderia ser uma ferramenta útil no rastreo e acompanhamento de pacientes infectados por estes tipos virais.

Gasperov e colaboradores (2008) em um estudo semelhante a este compararam o PCR-RFLP com a metodologia de hibridização reversa (INNO-LiPA) e obtiveram concordância perfeita para os tipos de HPV 16, 18, 34 e 59 (K=1), muito boa para os tipos 53, 56 e 58, boa para HPV 31 e 33, moderado para os tipos 66 e 73, razoável para os tipos 39, 45, 52 e 68. No presente estudo, quando avaliamos o desempenho do PCR-RFLP comparado com a metodologia de *microarray* (Papillocheck[®]) foi observada concordância perfeita para os tipos de HPV 33 e 58 (K=1), muito boa para o HPV 51 e boa para os tipos virais 16, 18, 53, 59, 66, 68, 70, e 73. Foi encontrada concordância moderada para os tipos 45 e 52, razoável para os tipos 6, 11, 35, 44/55 e pobre para os tipos 31, 39 e 55. Algumas diferenças observadas no presente estudo podem também ser atribuídas à diferença na sensibilidade dos iniciadores utilizados em cada método, gerando *amplicons* de tamanhos diferentes, PGMY0911 (450pb) e *microarray* (aproximadamente 350pb). Husnajak e colaboradores (2000) observaram que *amplicons* de tamanhos menores são mais eficientemente amplificados.

Não foi encontrada concordância entre as metodologias para os tipos virais 40, 42, 43, 56 e 82, pois estes tipos foram identificados somente pelo Papillocheck[®]. Entretanto, essas controvérsias poderiam ser explicadas pelo fato de os tipos virais 42 e 82 serem detectados em

proporções muito pequenas (1,3%, o que corresponde a uma amostra). Os tipos 42 e 43 foram encontrados somente em infecções múltiplas e o HPV 56 foi encontrado em infecções múltiplas em mais de 70,0% das infecções positivas para este tipo. Assim como no presente estudo, outros autores demonstraram que a eficiência da metodologia de PCR-RFLP diminui em infecções múltiplas (GASPEROV et al., 2008; NOBRE et al., 2008).

Assim, pode-se inferir que nenhum ensaio de detecção de HPV é perfeito, principalmente porque o PCR-RFLP não conseguiu identificar determinados tipos de HPV identificados pelo Papillocheck[®], e o PCR-RFLP identificou tipos virais que o Papillocheck[®] não é apto para identificar.

Em virtude da detecção de tipos virais pelo PCR-RFLP não identificados pelo Papillocheck[®] e de resultados inconclusivos no PCR-RFLP, o sequenciamento tornou-se uma ferramenta para a confirmação e resolução desses casos. Quando foi avaliada a concordância entre os resultados do PCR-RFLP com os resultados conjuntos do Papillocheck[®] e sequenciamento, observou-se uma concordância perfeita para os tipos de HPVs 32, 33, 70, 74, 83 e 84, muito boa para os tipos 16 e 51, boa para os tipos virais 18, 55, 59, 66, 68, 73, 61 e 89, moderada para os tipos 45, 52, 53 e 58, razoável para os tipos 6, 11, 35, 44 e 62 e pobre para os tipos 31 e 39. Da mesma maneira que na análise de concordância entre os métodos PCR-RFLP e Papillocheck[®], não foi encontrada concordância entre as metodologias para os tipos virais 40, 42, 43, 56 e 82, uma vez que estes tipos não foram identificados por sequenciamento e PCR-RFLP, pelos motivos já citados anteriormente. Observou-se uma melhora significativa na concordância entre o PCR-RFLP e os resultados conjuntos das metodologias de sequenciamento e *microarray*, possivelmente porque o PCR-RFLP e o sequenciamento detectaram os tipos virais expressos em maior quantidade na infecção, enquanto o *microarray* é uma metodologia mais sensível e, portanto capaz de identificar tipos virais que estão expressos em menor quantidade. Outro argumento é que o sequenciamento e o PCR-RFLP identificaram tipos virais (32, 61, 62, 70, 74, 83, 84 e 89) que não são identificados pelo Papillocheck[®].

Segundo Wild (2005), a sensibilidade e especificidade de um teste para diagnóstico devem ser superiores ou iguais a 80,0%, pois o teste deve ser capaz de identificar uma subpopulação que tenha um risco associado ao desenvolvimento da doença. Sensibilidades desejáveis

foram obtidas para os tipos virais 32, 33, 58, 70, 74, 83, 84 e 18. Embora a sensibilidade do PCR-RFLP tenha sido inferior ao desejável para a maioria dos tipos virais, a especificidade mostrou-se elevada, apresentando valores entre 98,65% e 100,0% para todos os tipos identificados por esta metodologia. Baixas sensibilidades no PCR-RFLP não significam que o HPV não possa ser identificado, pois as amostras são inicialmente rastreadas com a PCR multiplex, que se mostrou uma ferramenta eficaz no rastreio do HPV e CT. O PCR-RFLP talvez não seja capaz de discriminar os tipos virais presentes na infecção em algumas situações, principalmente em casos que a banda da PCR apresenta-se com intensidade fraca ou infecções múltiplas, ou casos em que determinados tipos virais são expressos em menor intensidade.

Testes de diagnóstico com elevado VPN são excelentes para o rastreio, uma vez que se pode confiar em um resultado negativo. O VPN do PCR-RFLP padronizado no presente estudo mostrou-se elevado para a grande maioria dos tipos virais, variando de 80,0% a 100,0%. Além do mais, o VPP do PCR-RFLP foi de 100% para uma gama de tipos virais (6, 16, 31, 32, 33, 35, 44, 45, 51, 53, 55, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 73, 74, 83, 84 e 89), demonstrando que a probabilidade de um indivíduo ter HPV quando detectado na PCR-RFLP é de quase 100% para a maioria dos tipos virais identificados por esse teste.

A acurácia de um teste diagnóstico depende de como este teste consegue diferenciar, por exemplo, um indivíduo com determinada infecção daquele sem infecção. Neste trabalho, a acurácia foi medida pela área sobre a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e foi considerada excelente para os tipos virais 32, 33 e 58, boa para os tipos virais 16, 18, 51, 58, 61, 53, 59, 66, 73 e 89. Porém foi considerada regular para os tipos 45, 62, 52, 55 e 35 e ruim para os tipos 31, 39 e 4

8 CONCLUSÕES

A prevalência do DNA de HPV foi de 24,6% (80/325) na amostra estudada. Para CT, a prevalência foi de 11,1% (36/325) e de 4,6% (15/325) para coinfeção HPV/CT.

A infecção por CT foi associada à variável número de parceiros ao longo da vida ($p=0,048$) e foi maior em mulheres com idade inferior a 24 anos. A coinfeção HPV/CT apresentou associação com as variáveis, idade ($p=0,06$) e uso de anticoncepcional oral ($p=0,011$).

As prevalências das infecções pelo HPV e HPVs de alto risco foram maiores em mulheres com idade igual ou inferior a 24 anos. A positividade do HPV foi associada às variáveis: citologia ($p<0,001$), idade ($p=0,001$), idade de início da atividade sexual ($p=0,008$) e o uso de anticoncepcional oral ($p=0,048$).

A genotipagem das amostras pelas três metodologias: PCR-RFLP sequenciamento e *microarray* mostrou 32 genótipos diferentes de HPV. O HPV 16 foi o mais prevalente (38,8%), seguido pelos tipos 39, 53, 68, 56, 31 e 66, 44/55, 45, 43, 52, 18, 62, 06, 11, 35, 51, 73 e 89.

A PCR-multiplex desenvolvida neste estudo mostrou-se útil no rastreio concomitante do HPV e da CT. A metodologia de PCR-RFLP teve um bom desempenho para a identificação simultânea de até dois tipos virais em uma mesma amostra. Entretanto, a eficácia desta metodologia pode ser melhorada com incorporação de uma estratégia com mais de uma metodologia.

A PCR-RFLP pode ser utilizada como um método de rastreio para determinar o genótipo de HPV em infecções simples (ou mesmo discriminar entre infecções simples ou múltiplas), enquanto a análise por uma metodologia com maior poder discriminatório pode ser utilizada como método complementar, principalmente em locais com poucos recursos financeiros. O sequenciamento mostrou-se uma excelente ferramenta para a identificação de infecções por um único tipo viral, enquanto o Papillocheck[®] foi o melhor método para amostras polinfectadas.

Embora a sensibilidade do RFLP tenha sido inferior ao desejável para a maioria dos tipos virais, a especificidade mostrou-se elevada (acima de 98,65%). O VPN do PCR-RFLP mostrou-se elevado (acima de 80,0%) na grande maioria dos tipos virais, demonstrando que esta metodologia pode ser útil no rastreio do HPV, visto que resultados negativos, metodologias com elevado VPN são confiáveis.

9 PERSPECTIVAS

- Estudar fatores de virulência na associação HPV/CT;
- Fazer estudo de corte com mulheres com menos de 24 anos e infectadas por, pelo menos, um tipo viral com o objetivo de acompanhar o *clearance* viral ou a evolução da citologia.

REFERÊNCIAS

- ACS- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer facts and figures**. 2nd Edition, Atlanta, 2008. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@demiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>. Acesso em 13 de janeiro de 2014.
- AHRQ - Agency for Healthcare Research and Quality. Screening for Chlamydial Infection: Clinical Summary of US Preventive Services Task Force. Rockville, 2007. Disponível em: <http://www.ahrq.gov/clinic/uspstf07/chlamydia/chalcsom.htm>. Acesso em 30 de dezembro de 2012.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 675-680, 2001.
- ALBA, A; CARARACH, M.; RODRÍGUES-CERDEIRA, C. The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. **The Open Dermatology Journal**, v.3, p. 90-102, 2009.
- ALLAN, L.A.; CLARKE, P.R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. **FEBS Journal**, v. 276, p. 6063-73, 2009.
- ALMONTE, M.; ALBERO, G.; MOLANO, M.; CARCAMO, C.; GARCÍA, P. J.; PÉREZ, G. Risk factors for human papillomavirus exposure and cofactors for cervical cancer in Latin America and the Caribbea **Vaccine**, v. 26, Suppl 11:L16-L36, 2008.
- ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman and Hall, 1991.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDREWS, W. W.; LEE, H. H.; RODEN, W. J. e MOTT, C. W. Detection of genitourinary tract *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant women by ligase chain reaction assay. **Obstetrics & Gynecology**, v. 89, p. 4, p. 556-560, 1997.

ARAL, S. O.; FENTON, K. A.; HOLMES, K. K. Sexually transmitted diseases in the USA: Temporal trends. **Sexually Transmitted Infection**. v. 83, n. 4, p. 257-266, 2007.

ARGYRI, E.; PAPASPYRIDAKOS, S.; TSIMPLAKI, E.; MICHALA, L.; MYRIOKEFALITAKI, E.; PAPASSIDERI, I.; DASKALOPOULOU, D.; TSIAOUSSI, I.; MAGIAKOS, G.; PANOTOPOULOU, E. A cross sectional study of HPV type prevalence according to age and cytology. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 53, 2013.

ANORLU, R. 2008. Cervical cancer: the sub-Saharan African perspective. **Reproductive Health Matters**, v. 16, n. 32, p. 41-49.

BARBEYRAC, B. Current aspects of Chlamydia trachomatis infection. **Presse Médicale**, v. 42, n.4, p. 440-445, 2013.

BARROS, N. K. S.; COSTA, M. C.; ALVES, R. R. F.; VILLA, L. L.; DERCHAIN, S. F. M.; ZEFERINO, L. C.; CARNEIRO M. A. S.; RABELO-SANTOS, S. H. Association of HPV Infection and *Chlamydia trachomatis* Seropositivity in Cases of Cervical Neoplasia in Midwest Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 84, p.:1143–1150, 2012.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of Human papillomavirus infections. **Journal Clinical Virology**, v. 32, Suppl 1: S16-S24, 2005.

BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M.; ONG, C. K.; VILLA, L. L.; DELIUS, H.; PEYTON, C. L.; BAUER, H. M.; WHEELER, C. M. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n.5, p. 1077-85, 1994.

BHATLA, N.; SINGLA, S.; AWASTHI, D. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in developed countries. **Best Practice &**

Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, v. 26, p. 209–220, 2012.

BLACK, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 160–184, 1999.

BOSCH, F. X. ; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M.; GIULIANO, A. R.; DE SANJOSE, S.; BRUNI, L.; TORTOLERO-LUNA, G.; KJAER, S. K.; MUÑOZ, N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and typespecific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v. 26, Suppl 10:K1–K16, 2008.

BOUVARD, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B, E. L.; GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; FREEMAN, C.; GALICHET, L.; COGLIANO, V.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens—part B: biological agents. **The lancet oncology**, v.10, n. 4, p. 321-322, 2009.

BOWDEN, F. J.; CURRIE, M. J.; TOYNE, H.; MCGUINNESS, C.; LIM, L. L.; BUTLER, J. R.; GLASGOW, N. J. Screening for *Chlamydia trachomatis* at the time of routine Pap smear in general practice: a cluster randomised controlled trial. **Medical Journal Australia**, v. 188, n. 2, p. 76–80, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis**, 3ªed. Brasília, DF, 1999. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_13.pdf> acesso em 22 de dezembro de 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis**, 4ªed. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_das_dst.pdf> acesso em 20 de dezembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. **Ministério da Saúde anuncia incorporação da vacina contra HPV no calendário nacional. 2013.** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/n>

oticias/2013/ministerio_saude_anuncia_incorporacao_vacina_contra_hpv_calendario_nacional. Acessado em 17 de setembro de 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal Brasil. **Vacina contra HPV passa a fazer parte do calendário de vacinação.** Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/01/vacina-contra-hpv-passa-a-fazer-parte-do-calendario-de-vacinacao>. Acesso em 25 de março de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. **Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero.** Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/conceito_magnitude. Acesso em 10 de janeiro de 2013b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis.** Ed. 4. Brasília, 2006.

BRUNHAM, R. C.; PEELING, R. W. Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 5, p. 218-233, 1994.

BRUNHAM, R. C.; PEELING, R.; MACLEAN, I.; KOSSEIM, M. L.; PARASKEVAS, M. Chlamydia trachomatis-associated ectopic pregnancy: serologic and histologic correlates. **The Journal of infectious diseases**, v. 165, n. 6, p. 1076-1081, 1992.

BUSTIN, S. A. *A-Z of Quantitative PCR*. 1. ed. La Jolla: International University Line, 2004.

CAPPELLO, F.; BELLAFFIORE, M.; PALMA, A.; MARCIANO, V.; MARTORANA, G.; BELFIORE, P.; MARTORANA, A.; FARINA F.; ZUMMO, G.; BUCCHIERI, F. Expression of 60-kD heat shock protein increases during carcinogenesis in the uterine exocervix. **Pathobiology**, v. 70, p. 83-88, 2002-2003.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 3, 2008.

CASTELLSAGUE, X.; BOSCH, F. X.; MUNOZ N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p.191-199, 2002.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUNOZ, N. Cofactors in Human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal National Cancer Institute Monogr**, v. 31, p. 20-28, 2003.

CASTLE, P. E.; CREMER, M. Human papillomavirus testing in cervical cancer screening. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 40, p. 377-390, 2009.

CASTLE, P. E.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; RODRIGUEZ, A. C.; BRATTI, M. C.; SHERMAN, M. E.; WACHOLDER, S.; TARONE, R.; BURK, R. D. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 11, p.1808-1816, 2005.

CASTLE, P.; SOLOMON, D.; WHEELER, C. M.; GRAVITT, P. E.; WACHOLDER, S.; SCHIFFMAN, M. Human Papillomavirus Genotype Specificity of Hybrid Capture 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2595-2604, 2008.

CASTRO, M. M.; FARIAS, I. P.; BORBOREMA-SANTOS, C. M.; CORREIA, G.; ASTOLFI-FILHO, S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n.1, p. 186–196, 2011.

CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F. N. Infecções Causadas Pelos Papilomavírus Humanos: Atualização Sobre Aspectos Viroológicos, Epidemiológicos e Diagnóstico – Review. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 1, p. 73-79, 2006.

CDC - Center For Disease Control and Prevention. FDA Licensure of Bivalent Human Papillomavirus Vaccine (HPV2, Cervarix) for Use in Females and Updated HPV Vaccination Recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, n. 20, 2010.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2011 Sexually Transmitted Diseases Surveillance: **Chlamydia**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats11/chlamydia.htm>. Acesso em 09 de outubro de 2013.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Chlamydia screening among sexually active young female enrollees of health plans - United States, 2000 - 2007. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 58, n. 14, p. 362-365, 2009.

CDC - Centers For Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Disases (STDs): HPV Vaccine Information for Clinicians** - Fact Sheet. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv-vaccine-hcp.htm>. Acesso em 18 de novembro de 2013.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease treatment guidelines. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, RR-11, p. 1-94, 2006.

CDC. CDC Grand Rounds: chlamydia prevention: challenges and strategies for reducing disease burden and sequelae. **MMWR-Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 12, p. 370-373, 2011.

CHATTERJEE, K. WILLIAMON, A-L.; HOFFMAN, M. DANDARA, C. *CASP8* promoter polymorphism is associated with high-risk HPV types and abnormal cytology but not with cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 4, p. 630-636, 2011.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; ANDERSON, W. F.; GILLISON, M.L. Incidence trends for human papillomavirus-related and-unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 612-619, 2008.

CHAUHAN, S. JASSI, M.; BELL, M.; VERMA, M.; KUMAR, D. Epidemiology of humana papillomavirus in cervical mucosa. **Methods Molecular Biology**, v. 471, p. 439-456, 2009.

CHAUHAN, S.; JAGGI, M.; BELL, M.; VERMA, M.; KUMAR, D. Epidemiology of human papillomavirus in cervical mucosa. **Methods in molecular biology**, v.471, p. 439-456, 2009.

CHOROSZY-KRÓL, I. C.; FREJ-MĄDRZAK, M.; JAMA-KMIECIK, A.; BOBER, T.; AROWSKA, J. Characteristics of the Chlamydia

trachomatisspecies–Immunopathology and Infections. **Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University**, v. 21, n. 6, p. 799-808, 2012.

CHRISTIAN, P.; KHATRY, S. K.; LECLERQ, S. C.; ROESS, A. A.; WU, L.; YUENGER, J. D.; ZENILMAN, J. Prevalence and risk factors of chlamydia and gonorrhoea among rural Nepali women. **Sexually Transmitted Infections**, v. 81, p. 254-258, 2005.

CLIFFORD, G.; FRANCESCHI, S. DIAZ, M.; MUNOZ, N. ; VILLA, L. L. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**, Suppl. 24S3: S3/26–S3/34, 2006.

CODES J. S.; COHEN, D. A, MELO, N. A.; SANTOS, A. B.; CODES, J. J. G.; SILVA JR, J. C.; RIZZO, R. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 2, p. 101-106, 2002.

COLE, S.T.; DANOS, O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. **Journal of molecular biology**, v. 193, p. 599-608, 1987.

COMANDUCCI, M.; RICCI, S.; CEVENINI, R.; RATTI, G. Diversity of the *Chlamydia trachomatis* common plasmid in biovars with diferente pathogenicity. **Plasmid**, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1990.

COSER, J.; BOEIRA TODA, R.; FONSECA, A.S.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R. Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 467-472, 2011.

COUtlÉE, F.; GRAVITT, P.; KORNEGAY, J.; HANKINS, C.; RICHARDSON, H.; LAPOINTE, N.; VOYER, H.; FRANCO, E. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p.902–907, 2002.

CUBIE, H. A.; CUSCHIERI, K. Understanding HPV tests and their appropriate applications. **Citopatologia**, v. 24, n. 5, p. 289-308, 2013.

CUSCHIERI, K. S.; CUBIE, H. A.; WHITLEY, M.W.; SEAGAR, A. L.; ARENDS, M. J.; MOORE, C.; GILKISSON, G.; MCGOOGAN, E. Multiple high-risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. **Journal Clinical Pathology**, v. 57, n. 1, p. 68-72, 2004.

DALSTEIN, V.; MERLIN, S.; BALI, C.; SAUNIER, M.; DACHEZ, R.; ROSIN, C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 156, n. 1-2, p. 77-83, 2009.

DARVILLE, T.; HILTKE, T. Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, p. 144-125, 2010.

DAVIES, R.; HICKS, R.; CROOK, T.; MORRIS, J.; VOUSDEN, K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. **Journal of virology**, v. 67, p. 2521-2528, 1993.

DAVIES, S. C.; KARAGIANNIS, T.; HEADON, V.; WIIG, R.; DUFFY, J. Prevalence of genital chlamydial infection among a community sample of young international backpackers in Sydney, Australia. **International Journal of STD & AIDS**, v. 22, n. 3, p. 160-164, 2011.

DE MARTEL, C.; FERLAY, J.; FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607-615, 2012.

DE SANJOSE, S. Human Papillomavirus and Cancer. Epidemiology and prevention. 4th Monograph of the Spanish Society of Epidemiology, p.143-147, 2006.

DELUCA, G. D.; BASILETTI, J. SCHELOVER, J.; DÍAZ VÁSQUEZ, N.; ALONSO J. M.; MARÍN, H. M.; LUCERO, R. H.; PICCONI, M. A. *Chlamydia trachomatis* as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina, **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 567-572, 2011.

DE SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D. T.; KLAUSTERMEIER, J. E.; LLOVERAS, B.; TOUS, S.; FELIX, A.; BRAVO, L. E.; SHIN, H. R.; VALLEJOS, C. S.; DE RUIZ, P. A.; LIMA, M. A.; GUIMERA, N.; CLAVERO, O.; ALEJO, M.; LLOMBART-BOSCH, A.; CHENG-YANG, C.; TATTI, S. A.; KASAMATSU, E.; ILJAZOVIC, E.; ODIDA, M.; PRADO, R.; SEOUD, M.; GRCE., M.; USUBUTUN, A.; JAIN, A.; SUAREZ, G. A.; LOMBARDI, L. E.; BANJO, A.; et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p.1048–1056, 2010.

DE SANJOSÉ, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n.7, p. 453-459, 2007.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R., BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DE RODA HUSMAN, A. M.; WALBOOMERS, J. M.; VAN DEN BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J. The use of general primers GP5 and GP6 5' elongated at their ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-1062, 1995.

DI FELICE, V.; DAVID, S.; CAPPELLO, F.; FARINA, F. Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 1, p.4-9, 2005.

DIALLO, M. O.; GHYS, P. D.; VUYLSTEKE, B.; ETTIEGNETRAORE, V.; GNAORE, E.; SOROH, D.; Kadjo, J. C.; Van Dyck, E.; De Cock, K. M.; Greenberg, A. E.; Laga, M. Evaluation of simple diagnostic algorithms for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* cervical infections in female sex workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. **Sexually Transmitted Infections**, v. 74, p. 106-111, 1998.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO nº 214 de 17/11/2007. Brasília, 2007.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science and molecular medicine**, v. 110, p. 525-541, 2006.

DRAIN, P. K.; HOLMES, K. K.; HUGHES, J. P.; KOTSKY, L. A. Determinants of cervical cancer rates in developing countries. **International Journal of Cancer**, v. 100, n. 2, p. 199–205, 2002.

D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W. M.; WESTRA, W. H.; GILLISON, M. L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **The New England journal of medicine**, v. 356, p. 1944–1956, 2007.

DUARTE, G. Clamídiase genital. In: **Diagnóstico e conduta nas infecções Ginecológicas e Obstétricas**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2004.

DUNNE, E.F.; UNGER, E.R.; STERNBERG, M.; MCQUILLAN, G.; SWAN, D.C.; PATEL, S.S.; MARKWITZ, L.E. Prevalence of HPV infection among females in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 297, p. 813–819, 2007.

EINSTEIN, M.; SCHILLER, J.; VISCIDI, R.; STRICKLER, H.; COURSAGET, P.; TAN, T.; HALSEY, N.; JENKINS, D. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, p. 347–356, 2009.

ETHIER, K. A.; KERSHAW, T.; NICCOLAI, L.; LEWIS, J. B.; ICKOVICS, J. R. Adolescent women underestimate their susceptibility to sexually transmitted infections. **Sexually Transmitted Disease**, v. 79, n. 5, p. 408–411, 2003.

FACINA, T. Estimativas 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 4, p. 557, 2011.

FARINA, C.; ORAVEC, R.; VEN POSER, B. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Chlamydia trachomatis* e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 125–133, 2002.

FAUSCH, S. C.; DA SILVA, D. M.; KAST, W. M. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. **American journal of cancer**, v. 63, p. 3478–3482, 2003.

FEDIZZI, E. M.; SCHLUP, C. G.; MENEZES, M. E.; CAMPOS, M. O. “Human Papillomavirus (HPV) infection in women of Florianópolis,

Santa Catarina, Brazil,” **Jornal Brasileiro de Doencas Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 73–79, 2008

FDA - Food and Drug Administration. **Gardasil** [human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, and 18) vaccine, recombinant]. Disponível em:

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM094042>Acesso em 17 de setembro de 2013a.

FDA- - Food and Drug Administration. **Vaccine, Blood & Biologics: June 8, 2006 Approval Letter - Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, 18) Vaccine, Recombinant**. Disponível em: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm111283.htm>. Acessado em 17 de setembro de 2013.

FDA - Food and Drug Administration. **Medical Devices: Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test - P890064 S009 A004 - 2003**. Disponível em:

<http://www.fda.gov/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/deviceapprovalsandclearances/recently-approveddevices/ucm082556.htm>. Acesso em 01 de outubro de 2013b.

FERNÁNDEZ-BENÍTEZ, C.; MEJUTO-LÓPEZ, P.; OTERO-GUERRA, L.; MARGOLLES-MARTINS, M. SUÁREZ-LEIVA, P.; VAZQUEZ, F. CHLAMYDIAL PRIMARY CARE GROUP. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 388, p. 1-8, 2013.

FERTEY, J.; HURST, J.; STRAUB, E.; SCHENKER, A.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8^EE2C proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein. **Journal of virology**, v. 85, p. 2918-2926, 2011.

FORSLUND, O.; IFTNER, T.; ANDERSSON, K.; LINDELOF, B.; HRADIL, E.; NORDIN, P.; STENQUIST, B.; KIRNBAUER, R.; DILLNER, J.; DE VILLIERS, E. M.; VIRASKIN STUDY GROUP. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. **The Journal of infectious diseases**, v. 196, p. 876-883, 2007.

FRANCESCHI, S.; SMITH, J. S.; VAN DEN BRULE, A.; HERRERO, R.; ARSLAN, A.; ANH, P. T.; BOSCH, F. X.; HIEU, N. T.; MATOS, E.; POSSO, H.; QIAO, Y. L.; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S.; THOMAS, J. O.; SNIJDERS, P. J.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J. Cervical infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women from ten areas in four continents. A cross-sectional study. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 34, n. 8, p.563-569, 2007.

FRANCO, E. D.; STEBEN, M. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecology Oncology**, v. 107, p. S2-S5, 2007.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J. P.; PRADO, J. M.; ROUSSEAU, M. C.; DÉSY, M.; ROHAN, T. E. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5; p. 1415-23, 1999.

FREGA, A.; LORENZON, L.; BONONI, M.; DE CESARE, A.; CIARDI, A.; LOMBARDI, D.; ASSORGI, C.; GENTILE, M.; MOSCARINI, M.; TORRISI, M. R.; FRENCH, D. Evaluation of E6 and E7 mRNA expression. in HPV DNA positive breast cancer. **European journal of gynaecological oncology**, v. 33, p. 167-167, 2012.

FREITAS, T. P.; DO CARMO, B. B.; PAULA, D. F.; RODRIGUES, L. F.; FERNANDES, A. P.; FERNANDES, A. A. Molecular Detection of HPV 16 and 18 in Cervical Samples of Patients From Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 297-301, 2007.

FRIAS, M. C. A. A.; PEREIRA, C. F. A.; PINHEIRO, V. M. S.; PINHEIRO, M. S.; ROCHA, C. F. Frequência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* Netto e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 13, p. 5-22, 2001.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q.; WHEELER, C. M.; COUTLÉE, F.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; SCOTT, D. R.; APPLE, R. J. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GASPEROV, N. M.; SABOR, I.; MATOVINA, M.; SPAVENTI, S.; GRCE, M. Detection and Typing of Human Papillomaviruses Combining Different Methods: Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, Line Probe Assay and Sequencing. **Pathology & Oncology Research**, v. 14, n. 4, p. 355-363, 2008.

GAYDOS, C. A.; DWYER, K.; BARNES, M.; RIZZO-PRICE, P. A.; WOOD, B. J.; FLEMMING, T.; HOGAN, M. T. Internet based screening for *Chlamydia trachomatis* to reach non-clinic populations with mailed self-administered vaginal swabs. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 33, n. 7, p. 451-457, 2006.

GAYDOS, C. A.; THEODORE, M.; DALESIO, N.; WOOD, B. J.; QUINN, T. C. Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.7, p. 3041-3045, 2004.

GELLER, M.; ABOIM, E.; CAMPOS, C. D. Papilomavirus humano – fatores de risco, carcinogenese, resposta imune e tratamento. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 94, n.3, p. 43-46, 2008.

GIARRÈ, M.; CALDEIRA, S.; MALANCHI, I.; CICCOLINI, F.; LEA, M.J.; TOM-MASINO, M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus Type 16E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a –imposed G1 cell cycle arrest. **Journal of virology**, v. 75, p. 4705-4712, 2001.

GIOVANELLI, L.; LAMA, A.; CAPRA, G.; GIORDANO, V.; ARICO, P.; AMMATUNA, P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3861-4864, 2002.

GIRALDO, P. C.; SILVA, M. J. PMA.; FEDRIZZI, E. N.; GONSALVES, A. K. S.; AMARAL, A. L.; ELEUTÉRIO JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, I. V. Prevenção da Infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 132-140, 2008.

GIRALDO, P. Enfoque atual sobre a infecção genital por *Chlamydia trachomatis*. DST- **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 12, n. 3, 2000.

GIRDNER, J. L.; CULLEN, A. P.; SALAMA, T. G.; HE, L.; LORINCZ, A.; QUINN, T. C. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II CT-ID Test for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1579-1581, 1999.

GIRGLOU, T.; FLORIN, L.; SCHAFER, L.; STREECK, R.; SAPP, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparine sulfate. **Journal of Virology**, v. 75, p 2001; 75: 1565-70.

GOLDENBERG, S.; SHOVELLER, J.; KOEHOORN, M.; OSTRY, A. Barriers to STI testing among youth in a Canadian oil and gas community. **Health and Place**, v. 14, n. 4, p. 718-729, 2008.

GOMPEL, C. KOSS, L. G. **Citologia ginecológica e suas bases anatômicas**. 1 ed. São Paulo: Manole, 1997.

GONZÁLEZ, P.; HILDESHEIM, A.; RODRÍGUEZ, A. C.; SCHIFFMAN, M.; PORRAS, C.; WACHOLDER, S.; PIÑERES, A. G.; PINTO, . LA.; BURK, R. D.; HERRERO, R. Behavioral/lifestyle and immunological factors associated with HPV infection among women older than 45 years of age. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 12, p. 3044-3054, 2010.

GOTTLIEB, S. L.; MARTIN, D. H.; XU, F.; BYRNE, G. I.; BRUNHAM, R. C. Introduction: The Natural History and Immunobiology of *Chlamydia trachomatis* Genital Infection and Implications for Chlamydia Control. **Journal of Infectious Diseases**, Suppl. 2, 201: S85-S87, 2010.

GÖTZ, H.; LINDBACK, J.; RIPA, T.; ARNEBORN, M.; RAMSTED, K.; EKDAHL, K. Is the increase in notifications of Chlamydia trachomatis infections in Sweden the result of changes in prevalence, sampling frequency or diagnostic methods? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 28-34, 2002.

GRASECK, A. S.; SECURA, G. M.; ALLSWORTH, J. E.; MADDEN, T.; PEIPERT J. F. Home Compared With Clinic-Based Screening for Sexually Transmitted Infections: A Randomized Controlled Trial. **Obstetrics & Gynecology**, v. 116, n. 6, p. 1311-1318, 2010.

- GRIFFAIS, R. THIBON, M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. **Research in Microbiology**, v. 140, n. 2, p. 139-141, 1989.
- GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. **Circulation**, v. 106, n. 21, p. 2727– 2733, 2002.
- HAEDICKE, J.; IFNER, T. Human papillomaviruses and cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 108, n. 03, p. 397-402, 2013.
- HAGGERTY, C. L.; GOTTLIEB, S. L.; TAYLOR, B. D.; LOW, N.; XU, F.; NESS, R. B. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, Suppl. 2, S134–S155, 2010.
- HAMID, N.; BROWN, C.; GASTON, K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, p. 1700-1717, 2009.
- HAWS, A. L.; HE, Q.; RADY, P. L.; ZHANG, L.; GRADY, J.; HUGHES, T. K.; STISSER, K.; KONIG, R.; TYRING, S. K. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 87-93, 2004.
- HO, G. Y.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C. J.; BURK, R. D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal Medicine*, v. 338, n. 7, p. 423-428, 1998.
- HOCKING, J. S.; WILLIS, J.; TABRIZI, S.; FAIRLEY, C. K.; GARLAND, S. M.; HELLARD, M. A chlamydia prevalence survey of young women living in Melbourne, Victoria. **Sex Health**, v. 3, n. 4, p. 235–240, 2006.
- HOCKING, J. S.; GUY, R.; WALKER, J.; TABRIZI, S. N. Advances in sampling and screening for chlamydia. **Future Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 367–386, 2013.
- HONEY E, AUGOOD C, TEMPLETON A, RUSSELL I, PAAVONEN J, MÅRDH PA, STARY A, STRAY-PEDERSEN B: Cost effectiveness for screening for *Chlamydia trachomatis*: a review of published studies. **Sexually Transmitted Infections**, v.78, p. 406–412, 2002.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 940-945, 2003.

HUBBERT, N. L.; SEDMAN, S. A.; SCHILLER, J. T. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 66, p. 6237-6241, 1992.

HUSNJAK, K.; GRCE, M.; MAGDIĆ, L.; PAVELIĆ, K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal Virological Methods**, v. 88, n. 2, p. 125–134, 2000.

IBEANU, O. A. Molecular pathogenesis of cervical cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 295-306, 2011.

IFTNER, T.; VILLA, L. L. Human Papillomavirus Technologies. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 80–88, 2003.

JACOBSON, D. L., PERALTA, L.; GRAHAM, N. M.; ZENILMAN, J. Histologic development of cervical ectopy: relationship to reproductive hormones. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 27, n. 5, p. 252-258, 2000.

JALIL, E. M.; PINTO, V.M.; BENZAKEN, A. S.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, E. C.; GARCIA, E.G.; MOHERDAU, F.; BARBOSA, M. J. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 12, p. 614-9, 2008.

JEANTET, D.; TROMP, J.; MELCHERS, W. J. G.; wan der WURFF, A. A. M.; OOSTERLAKEN, T.; JACOBS, M.; TROESH, A. NucliSENS® EasyQ® HPV v1 test – Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v.45, Suppl 1, p. S29-S37, 2009.

JENKINS, W.; RABINS, C.; BARNES, M.; AGREDA, P.; GAYDOS, C. Use of the internet and self-collected samples as a sexually transmissible infection intervention in rural Illinois communities. **Sexual Health**, v. 18, n.1, 2011

JHA, R.; VARDHAN, H.; BAS, S.; SALHAN, S.; MITTAL, A. *Chlamydia trachomatis* heat shock proteins 60 and 10 induce apoptosis

in endocervical epithelial cells. **Inflammation Research**, v. 60, p.69–78, 2011.

KALAKUN, L.; BOZZETTI, M. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 299-309, fev. 2005.

KANESHIMA, E. N.; BIDOIA, C. C. G.; GABRIEL, M.; SUZUKI, L. E.; CONSOLARO, M. E. L. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepak, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 731-737, 2001.

KHAN, M. J.; PARTRIDGE, E. E.; WANG, S. S.; SCHIFFMAN, M. Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic Human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. **Cancer**, v. 104, n. 1, p. 61-70, 2005.

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**, Suppl. 24S3: S3/63–S3/70, 2006.

MANOS, M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p.209-214, 1989.

KIRCHHOFF, S. R., GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis and myocardial injury. **Circulation**, v. 105, n. 24, p. 2899–2904, 2002.

KJAER, S. K.; SIGURDSSON, K.; IVERSEN, O. E.; AVILA, M. H.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; BROWN, D. R.; KOUTSKY, L. A.; TAY, E. H.; GARCÍA, P.; AULT, K. A.; GARLAND, S. M.; LEODOLTER, S.; OLSSON, S. E.; TANG, G. W. K.; FERRIS, D. G.; PAAVONEN, J.; LEHTINEN, M.; STEBEN, M.; BOSCH, F. X.; DILLNER, J.; JOURA, E. A.; MAJEWSKI, S.; MUÑOZ, N.; MYERS, E.; VILLA, L.; TADDEO, F. J.; ROBERTS, C.; TADESSE, A.; BRYAN, J.; MAANSSON, R.; LU, S.; VUOCOLO, S.; HESLEY, T. M.; SAAH, A.; BARR, E.; HAUPT, R. M. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus

(Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. **Cancer prevention research**, v. 2, p. 868-878, 2009.

KLETER, B.; VAN DOORN, L. J.; SCHRAUWEN, L.; MOLIJN, A.; SASTROWIJOTO, S.; SCHEGGET, J.; LINDEMAN, J.; HARMSEK, B.; BURGER, M.; QUINT, W. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiol**, v. 37, n. 8, p. 2508-2517, 1999.

KOL, A.; SUKHORA, G. K.; LICHTMAN, A. H.; LIBBY, P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. **Circulation**, v. 98, n. 4, p. 300-307, 1998.

KÓNYA, J.; VERESS, G.; JUHÁSZ A.; SZARKA, K.; SÁPY, T. HERNÁDI, Z.; GERGELY, L. Additional Human Papillomavirus Types Detected by the Hybrid Capture Tube Test among Samples from Women with Cytological and Colposcopic Atypia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 408-411, 2000.

KORNYA, L.; C. S. E. H, I.; DEAK, J.; BAK, M.; FULOP, V. The diagnostics and prevalence of genital Human papillomavirus (HPV) infection in Hungary. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 100, n. 2, p. 231-236, 2002.

KOSKELA P.; ANTTILA, T., BJORGE, T.; BRUNSVIG, A.; DILLNER, J.; HAKAMA, M. ; HAKULINEN, T.; JELLUM, E. ; LEHTINEN, M.; LENNER, P.; LUOSTARINEN, T.; PUKKALA, E.; SAIKKU, P. ;THORESEN, S.; YOUNGMAN, L.; PAAVONEN, J. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *International Journal Cancer*, v. 85, n. 1, p. 35–39, 2000.

KULASINGAM, S. L.; HUGHES, J.P.; KIVIAT, N. B.; MAO, C.; WEISS, N. S.; KUYPERS, J. M.; KOUTSKY, L. A. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n.14, p.1749-1757, 2002.

LAN, P. T.; LUNDBORG, C. S.; PHUC, H. D.; SIHAVONG, A.; UNEMO, M.; CHUC, N. T.; KHANG, T. H.; MOGREN, I. Reproductive tract infections including sexually transmitted infections: a population-based study of women of reproductive age in a rural district of Vietnam. **Sexually transmitted infections**, v. 84, p. 126-132, 2008.

LEE, S. J.; PARK, D. C.; LEE, D. S.; CHOE, H. S.; CHO, Y. H. Evaluation of Seeplex(R) STD6 ACE Detection kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infections. *Journal of Infection Chemotherapy*, v.18, n. 4, p.:494-500, 2012.

LEHOUX, M.; D'ABRAMO, C. ARCHAMBAULT, J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. **Public Health Genomics**, v. 12, p. 268-280, 2009.

LETIAN, T.; TIANYU, Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. **Virology Journal**, v. 7, p. 1-7, 2010.

LEWIS, D.; NEWTON, D. C.; GUY, R. J.; ALI, H., CHEN, M. Y.; FAIRLEY, C. K.; HOCKING, J. S. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in Australia: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v.12, n.113, p.1-18, 2012.

LI, N.; FRANCESCHI, S.; HOWELL-JONES, R.; SNIJDERS, P. J. F.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers world-wide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **International journal of cancer**. v. 128, n. 5, p. 927-935, 2011.

LIE, A. K.; RISBERG, B.; BORGE, B.; SANDSTAD, B.; DELABIE, J.; RIMALA, R.; ONSRUD, M.; THORESEN, S. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. **Gynecologic Oncology**, n. 97, p. 908–915, 2005.

LIPPMAN, S. A.; SUCUPIRA, M. C. A.; JONES, H. E. LUPPI, C. G.; PALEFSKY, J.; VAN DE WIJGERT, J. H. H. M.; OLIVEIRA, R. L. S.; DIAZ, R. S. Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women, **International Journal of STD and AIDS**, v. 21, n. 2, p. 105–109, 2010.

LIZANO, M. BERUMEM, J.; GARCIA-CARRANCA, A. HPV-related carcinogenesis: Basic concepts, viral types and variants. **Archives of Medical Research**, v. 40, p. 428-34, 2009.

LOW, N. Screening programmes for chlamydial infection: when will we ever learn? **British Medical Journal**, v. 334, n. 725, p. 725-728, 2007.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1167-1173, 2006.

LUNGU, O.; WRIGHT, T. C.; SILVERSTEIN, S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, n. 2, p. 145-152, 1992.

MAGALHÃES, I. M.; MOYSÉS, N.; AFONSO, L. A.; OLIVEIRA, L. H. S.; CAVALCANTI, S. M. B. Comparison of two pairs of primers used in polymerase chain reaction for the detection of human papillomaviruses in cervical smears. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 93-98, 2008.

MAHONEY, J. B.; CHERNESKY, M. A. Chlamydia and Chlamydia, In: MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; JORGENSEN, J. H. Manual of Clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Press, 2003.

MALIK, H.; KHAN, F. H.; AHSAN, H. Human papillomavirus: current status and issues of vaccination, **Archive of Virology**, v.159, n. 2, p. 199-205, 2013.

MALHOTRA, M.; SOOD, S.; MUKHERJEE, A.; MURALIDHAR, S.; BALA, M. Genital Chlamydia trachomatis: An update. **Indian Journal of Medical Research**, v. 138, p. 303-316, 2013.

MANAVI, K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 20, n. 6, p. 941-951, 2006.

MANHART, L. E.; HOLMES, K. K.; KOUTSKY, L. A.; WOOD, T. R.; KENNEY, D. L.; FENG, Q.; KIVIAT, N. B. Human papillomavirus infection among sexually active young women in the United States: implications for developing a vaccination strategy. **Sexually Transmitted Disease**, v. 33, n. 8, p. 502-508, 2006.

MANSOUR, M.; TOUKA, M.; HASAN, U.; BELLOPEDE, A.; SMET, A.; ACCARDI, R.; GABET, A.-S.; SYLLA, B.S.; TOMMASINO, M.

E7 properties of mucosal human papillomavirus types 26,53 and 66 correlate with their intermediate risk for cervical development. **Virology**, v. 367, n. 1, p. 1-9, 2007.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7874-7887, 2001.

MARKLE, W., CONTI, T.; KAD, M. Sexually Transmitted Diseases. **Prim Care Clinics in Office Practice**, v. 40, p. 557–587, 2013.

MARKOWSKA, J.; FISCHER, N.; FILAS, V.; FISCHER, Z.; BREBOROWICZ, J.; MARKOWSKI, M. The role of *Chlamydia trachomatis* infection in cervical cancer development. **European Journal Gynaecological Oncology**, v. 20, n. 2, p.144–146, 1999.

MARTINS, T. R.; FEDRIZZI, E. F.; ALVEZ, E. V.; VITURI, C. L.; SILVA, R. M.; BAZZO, M. L. Cervical cytology, HPV DNA and mRNA – a comparative study in 162 patients. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 24, n. 2, p. 9-14, 2012.

MOLIJN, A.; KLETER, B.; WIM, Q.; VAN DOORN, L. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.

MONTEIRO, E. F.; LACEY, C. J.; MERRICK, D. The interrelation of demographic and geospatial risk factors between four common sexually transmitted diseases. **Sexually Transmitted Infections**, v. 81, p. 41-46, 2005.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to 25 transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p.550-560, 2010.

MOSCICKI, A. B. Impact of HPV infection in adolescent populations – Review. **Journal of Adolescent Health**, v. 37, S3–S9, 2005.

MOULDER, J. W. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 1, p. 143-190, 1991.

MOYSÉS, N.; BALTHAZAR, D. S.; AFONSO, L. A.; OLIVEIRA, L. H. S.; CAVALCANTI, S. M. B. Evaluation of the combined use of papanicolaou screen test and the polymerase chain reaction for the

identification of patients at risk of cervical cancer, **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 99–103, 2008.

MUNGER, K.; BASILE, J. R.; DUENSING, S.; EICHTEN, A.; GONZAQUEZ S. L.; GRACE, M.; ZACNY, V. L. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7888-7898, 2001.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. CHAPTER 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 3-10, 2006.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J.; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England journal of medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

MUNOZ, N.; HERNANDEZ-SUAREZ, G.; MENDEZ, F.; MOLANO, M.; POSSO, H.; MORENO, V.; MURILLO, R.; RONDEROS, M.; MEIJER, C.; MUNOZ, A. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1184-1190, 2009.

NADAL, S.R.; MANZIONE, C. R. Vacinas contra o papilomavirus humano. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 3, p. 337-340, 2006.

NAUD, P.; MATOS, J.; HAMMES, L.; STUCKZYNSKI, J.; BROUWERS, MAGNO V.; DIAS, E.; CRUSIUS, P.; D'AVILA, A.; CAMPOS, C.; COSTA, M.; HÖBLIK, M.;

MARC, C.; MARRONI, R.; SYRJÄNEN, K. Factors predicting intermediate endpoints of cervical cancer and exposure to Human papillomavirus (HPV) infections in young women screened as potential targets for prophylactic HPV vaccination in south of Brazil. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 124, n. 1, p.110–118, 2006.

NCSSG - National Chlamydia Screening Steering Group. New Frontiers: Annual report of the National Chlamydia Screening

Programme in England 2005/06. London: Health Protection Agency, 2006.

NESS, R. B.; SOPER, D. E.; HOLLEY, R. L.; PEIPERT, J.; RANDALL, H.; SWEET, R. L.; SONDEHEIMER, S. J.; HENDRIX, S. L.; AMORTEGUI, A.; TRUCCO, G.; SONGER, T.; LAVE, J. R.; HILLIER, S. L.; BASS, D. C.; KELSEY, S. F. Effectiveness of inpatient and outpatient treatment strategies for women with pelvic inflammatory disease: results from the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) randomized trial. **American journal of obstetrics and gynecology Gyneco**, v. 186, n. 5, p. 929-937, 2002.

NOBRE, R. J.; ALMEIDA, L. P.; MARTINS, T. C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 13-21, 2008.

OLIVEIRA, M. L. **Infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais**. 2007. 74f. Dissertação (Mestre em Saúde Materno- Infantil)- Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira, Brasil, 2007.

NONNENMACHERA, B.; BREITENBACHA, V.; VILLAB, L. L.; PROLLAC, J. C.; BOZZETTIC, M. C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Revista de Saúde Pública**, Porto Alegre, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002.

OLIVEIRA, M. L.; AMORIM, M. M. R.; SOUZA, A. S. R.; ALBUQUERQUE, L. C. B.; COSTA, A. A. R. Infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 6, p. 506-12, 2008.

O'ROURKE, K. M.; FAIRLEY, C. K.; SAMARANAYAKE, A.; COLLIGNON P.; HOCKING, J. S. Trends in Chlamydia positivity over time among women in Melbourne Australia, 2003 to 2007. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 36, n. 12, p. 763-767, 2009.

PAAVONEN, J. Baseline demographic characteristics of subjects enrolled in international quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) vaccine clinical trials. **Current Medical Research and Opinion**, V. 24, n. 6, p. 1623-1634, 2008.

PAAVONEN, J. *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract: State of the art. **Annals of Medicine**, v. 44, p. 18-28, 2012.

PAAVONEN, J.; NAUD, P.; SALMERON, J.; WHEELER, C. M. ; CHOW, S. N.; APTER, D.; KITCHENER, H.; CASTELLSAGUE, X.; TEIXEIRA, M. D.; SKINNER, S. R.; HEDRICK, J. JAISAMRARN, U.; LIMONS, G.; GARLAND, S.; SZAREWSKI, A.; ROMANOWSKI, B.; AOKI, F. Y.; SCHWARZ, T. F.; POPPE, W. A. J.; BOSH, F. X.; JENKINS, D. HARDT, K.; ZAHAF, T.; DESCAMPS, D.; STRUYF, F.; LEHTINEN, M. D.; DUBIN, G. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. **The Lancet**, v. 374, p. 301-314, 2009.

PAESI, S.; SERAFINI, E. P.; BAREA, F.; MADI, S. R. C.; ECHEVERRIGARAY, S. High Prevalence of Human Papillomavirus Type 58 in Patients With Cervical Pre-malignant Lesions in Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1270–1275, 2009.

PASSOS, M. R. L.; ALMEIDA, G.; GIRALDO, P. C.; CAVALCANTI, S. M. B.; CÔRTEZ, J. C.; BRAVO, R. S.; VARELLA, R. Q.; FIALHO, S. C. A.; VAL, I. C. C. Papilomavírose Humana em Genital, Parte I. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 108-124, 2008.

PEIPERT, J. F. Genital chlamydial infections. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n.25, p. 2424–2430, 2003.

PETERSON, E. M.; MARKOFF, B. A.; SCHACHTER, J.; MAZA, L. M. The 7.5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. **Plasmid**, v. 23, p. 144-148, 1990.

PIAS, A. A.; VARGAS, V. R. A. Avaliação dos exames citológicos de papanicolaou com células epiteliais atípicas e respectivos exames colposcopicos com relação aos exames histopatológicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 2, p. 155-160, 2009.

PIAZZETTA, R. C. P. S.; DE CARVALHO, N. S.; R. P. A.; PIAZZETTA, G.; PIAZZETTA, S. R.; CARNEIRO, R. Prevalência da infecção por *Chlamydia Trachomatis* e *Neisseria Gonorrhoea* em

mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 11, p. 328-333, 2011.

PINTO, D. S.; FUZII, H. T.; QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. *Caderno de Saúde Pública*, v. 27, n.4, p. 769-778, 2011.

PLUMMER, M.; SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; MAUCORT-BOULCH, D.; WHEELER, C. M. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 11, p. 1582-1589, 2007.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A. GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O. Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 1, 2008.

RAMET, J.; VAN, D. E.; MESZNER, Z. HPV and the primary prevention of cancer; improving vaccine uptake by paediatricians. **European journal of pediatrics**, v. 170, p. 309–321, 2011.

RAMOS, M. C.; 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. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 15, n. 2, p. 12, 2003.

RANK, R. G.; SANDERS, M. M.; Pathogenesis of endometritis and salpingitis in a guinea pig model of chlamydial genital infection. **The American Journal of Pathology**, v. 140, n. 4, p. 927-936, 1992.

RATNAM, S.; COUTLEE, F.; FONTAINE, D.; BENTLEY, J.; ESCOTT, N.; GHATAGE, P.; GADAG, V.; HOLLOWAY, G.; BARTELLAS, E.; KUM, N.; GIEDE, C.; LEAR, A. Clinical Performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA Assay in Comparison with That of the Hybrid Capture 2 Test for Identification of

Women at Risk of Cervical Cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2779–2785, 2010.

RASMUSSEN, S. J.; ECKMANN, L.; QUAYLE, A. J.; SHEN, L.; ZHANG, Y. X.; ANDERSON, D. J.; FIERER, J.; STEPHENS, R. S.; KAGNOFF, M.F. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 77-87, 1997.

RICHART, R. M. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clinical Gynecology and Obstetrics**, v. 10, n. 2, p.748-84, 1967.

RIVERO, E. R.; NEVES, A. C.; SILVA-VALENZUELA, M. G.; SOUSA, S. O.; NUNES, F. D. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Pathology Research Practice**, v.202, n.7, p.523-529, 2006.

ROBERTSON, J. N.; WARD, M. E.; CONWAY, D, CAUL, E. O. Chlamydial and gonococcal antibodies in sera of infertile women with tubal obstruction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 377-383, 1987.

ROCHA, D. A. P.; BARBOSA FILHO, R. A. A.; QUEIROZ, F. A.; SANTOS, C. M. B. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

RODRÍGUEZ, A. C.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; WACHOLDER, S.; HILDESHEIM, A.; CASTLE, P. E.; SOLOMON, D.; BURK, R.; Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 7, p. 513-517, 2008.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA C. Tumores malignos. **Monografias Dermatologia**, v. 21, p. 393-401, 2008.

RONCO, G.; GIORGI-ROSSI, P.; CAROZZI, F.; CONFORTINI, M.; DALLA PALMA, P.; DEL MISTRO, A.; GHIRINGHELLO, B.; GIRLANDO, S.; GILLIO-TOS, A.; DE MARCO, L.; NALDONI, C.; PIEROTTI, P.; RIZZOLO, R.; SCHINCAGLIA, P.; ZORZI, M.;

ZAPPA, M.; SEGNAN, N.; CUZICK, J. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 3, p. 249–257, 2010.

ROSENBLATT, C.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G.; WROCLAWSK, E. R. **HPV na Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 285 p.

RYAN, C. A.; ZIDOUH, A.; MANHART, L. E.; SELKA, R.; XIA, M.; MOLONEY-KITTS, M.; MAHJOUR, J.; KRONE, M.; COURTOIS, B. N.; DALLABETTA, G.; HOLMES K. K. Reproductive tract infections in primary healthcare, family planning, and dermatovenereology clinics: evaluation of syndromic management in Morocco. **Sexually Transmitted Infections**, v. 74, p. 95-105, 1998.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SAMALI, A.; CAI, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; JONES, D. P.; ORRENIUS, S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. **EMBO Journal**, v. 18. p.2040–8, 1999.

SAMOFF, E.; KOUMANS, E. H.; MARKOWITZ, L. E.; STERNBERG, M.; SAWYER, M. K.; SWAN, D.; PAPP, J. R.; BLACK, C. M.; UNGER, E. R. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. **American Journal Epidemiology**, v. 162, n. 7, p. 668–675, 2005.

SANO, T.; OYAMA, T.; KASHIWABARA, K.; FUKUDA, T.; NAKAJIMA, T. Expression status of p16 protein is associates with papillomavirus onco-genic potential in cervical and genital lesions. **The American journal of pathology**, v. 153, n. 6, p. 1741-1748, 1998.

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F. VICENTE, A. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active in Manaus-AM, Brasil, by PCR. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 7, n. 2, p. 91-95, 2003.

SCHACHTER, J.; STAMM, E. W. *Chlamydia trachomatis*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, D.C: ASM Press, 1999.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E. - Human papillomavirus: epidemiology and publichealth. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127: 930-934, 2003.

SCHIFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A. C. Heterogeneity in CIN3 diagnosis. **The lancet oncology**, v. 9, n. 5, p. 404-406, 2008.

SCHIFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A.; CHEN, Z.; WACHOLDER, S.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; DESALLE, R.; BEFANO, B.; YU, K.; SAFAEIAN, M.; SHERMAN, M. E.; MORALES, J.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; SOLOMON, D.; CASTLE, P. E.; BURK, R. D. A population-based prospective study of carcinogenic human papilloma-virus variant lineages, viral persistence and cervical neoplasia. **American journal of cancer**, v.70, p. 3159-3169, 2010.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER, S.; KINNEY, W.; GAGE, J. C.; CASTLE, P. E. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.103, n. 5, p. 368-383, 2011.

SCHIFFMAN, M.; WHEELER, C. M.; CASTLE, P. E. Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 8, p. 1169-1172, 2002.

SETH-SMITH, H. M.; HARRIS, S. R.; PERSSON, K.; MARSH, P.; BARRON, A.; BIGNELL, A.; BJARTLING, C.; CLARK, L.; CUTCLIFFE, L. T.; LAMBDEN, P. R.; LENNARD, N.; LOCKEY, S. J.; QUAIL, M. A.; SALIM, O.; SKILTON, R. J.; WANG, Y.; HOLLAND, M. J.; PARKHILL, J.; THOMSON, N. R.; CLARKE, I. N. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

SHEW, M. L.; ERMEL, A. C.; WEAVER, B. A.; TONG, Y.; TU, W.; KESTER, L. M.; DENSKI, C.; FORTENBERRY, J. D.; BROWN, D. R. Association of *Chlamydia trachomatis* infection with redetection of

human papillomavirus after apparent clearance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 9, p. 1416-1421, 2013.

SILINS, I.; RYD, W.; STRE, A.; WADELL, G.; TORNBERG, S.; HANSSON, B. G.; WANG, X.; ARNHEIM, L.; DAHL, V.; BREMELL, D.; PERSSON, K.; DILLNER, J.; RYLEER, E. *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 1, p.110–115, 2005.

SILVA, M. J. P. M. A.; GONÇALVES, A. K. S.; ANDRADE, C. F.; PONTES, A. C. FLORÊNCIO, G. L. D.; ARAÚJO, E. D et al. O valor do rastreamento da infecção por clamídia na redução da morbidade do trato genital feminino. **Revista Brasileira de Ginecologia**, v.3, n. 3-4, p. 97-100, 2009.; 3(3-4).

SILVA, J.; CERQUEIRA, F.; RIBEIRO, J.; SOUSA, H.; OSÓRIO, T.; MEDEIROS, R. Is *Chlamydia trachomatis* related to human papillomavirus infection in young women of southern European population? A self-sampling study. **Archives Gynecology Obstetrics**, v. 288, p. 627–633, 2013.

SIMMS, I.; TALEBI, A.; RHIA, J.; HORNER, P.; FRENCH, R. S.; SARAH, R. The English National Screening Programme: variation in positivity in 2007/2008. **Sexually transmitted diseases**, v. 36, p. 522-527, 2009.

SIMONETTI, A. C.; MELO, J. H.; DE SOUZA, P. R.; BRUNESKA, D.; DE LIMA FILHO, J. L. Immunological's host profile for HPV and *Chlamydia trachomatis*, a cervical cancer cofactor. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 4, p. 435–442, 2009.

SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo uterino e vagina: processos inflamatórios– aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos**. Rio de Janeiro: Revinter, p. 193-200, 2000.

SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.

SMITH, J. S.; MUÑOZ, N.; HERRERO, R.; ELUF-NETO, J.; NGELANGEL, S.; BOSCH, F. X.; WALBOOMERS, J. M.; PEELING,

R. W. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. **The Journal Infectious Diseases**, v. 185, n.3, p.324-331, 2002.

SNIDJERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **Acta Pathologica, Microbiologica et immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 520-528, 2010.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Citology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2004. 191 p.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**. v. 4, n. 1, p. 16-22, 2006.

STEPHENS, R. S. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. **Trends in microbiology**, v. 11, p. 44–51, 2003.

STEBEN, M.; FRANCO, E.D. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. **Gynecologic Oncology**, v. 107, S2-S5, 2007.

STEPHENS, R. S.; KALMAN, S.; LAMMEL, C.; FAN, J.; MARATHE, R.; ARAVIND, L.; MITCHELL, W.; OLINGER, L.; TATUSOV, R. L.; ZHAO, Q.; KOONIN, E. V.; DAVIS, R. W. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. **Science**, v. 23, p. 754-759, 1998.

STOTHARD, D. R.; TOTH, G. A.; BATTEIGER, B. Polymorphic Membrane Protein H Has Evolved in Parallel with the Three Disease-Causing Groups of *Chlamydia trachomatis*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1200-1208, 2003.

STOTHARD, D. R.; WILLIAMS, J. A.; VAN DER POL, B.; JONES, R. B. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 6010-6013, 1998.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINIS, L. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Seminars in cancer biology**, v. 9, p. 379-386, 1999.

SU, W. H.; TSOU, T. S.; CHEN, C. H.; HO, T. Y.; LEE, W. L.; YUG, Y. Y.; CHEN, T. J.; TAN, C. H.; WANG, P. H. Diagnosis of Chlamydia infection in women. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 50, p. 261-267, 2011.

TAM, J. E.; DAVIS, C. H.; THRESHER, R. J.; WYRICK, P. B. Location of the origin of replication for the 7.5-kb *Chlamydia trachomatis* plasmid. **Plasmid**, v. 27, p. 231-236, 1992.

TAMIM, H.; FINAN, R. R.; SHARIDA, H. E.; RASHID, M.; ALMAWI, W. Y. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n.4, p.277-281, 2002.

TAO, G. HOOVER, K. W., KENT, C. K. Chlamydia testing patterns for commercially insured women, 2008. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 42, n. 4, p. 337-341, 2012.

TAPE, T. G. **Interpreting Diagnostic Tests: ROC Curves**. University of Nebraska Medical Center. Disponível em: <<http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC1.htm>>. Acesso em 20 de dezembro de 2013.

TAVARES, M.C.; DE MACÊDO, J. L.; DE LIMA JÚNIOR, S. F.; DE ANDRADE HERÁCLIO, S.; AMORIM, M. M.; DE MASCENA DINIZ MAIA, M.; DE SOUZA, P. R. *Chlamydia trachomatis* infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 2, p. 865-874, 2013.

THOMISSON, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The Epidemiology of genital Human papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24, Suppl 1: S1-S15, 2006.

TU, W.; BATTEIGER, B. E.; WIEHE, S.; OFNER, S.; VAN DER POL, B.; KATZ, B. P.; ORR, D. P.; FORTENBERRY, J. D. Time from first intercourse to first sexually transmitted infection diagnosis among adolescent women. **Archives of pediatrics and adolescent medicine**, v. 163, p. 1106-1111, 2009.

URMAN, C.O.; GOTTLIEB, A. B. New viral vaccines for dermatologic disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, p. 361–370, 2008.

VAN DER POL, B.; WILLIAMS, J. A.; SMITH, N. J.; BATTEIGER, B. E. CULLEN, A. P.; ERDMAN, H.; EDENS, T.; DAVIS, K.; SALIM-HAMMAD, H.; CHOU, V. W.; SCEARCE, L.; BLUTMAN, J.; PAYNE, W. J. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the Rapid Capture System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3558–3564, 2002.

VAN DOORN, L. J.; KLETER, B.; QUINT, W. G. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 1, n. 4, p. 394-402, 2001.

VELDHUIJZEN, N. J.; SNIJDERS, P. J.; REISS, P.; MEIJER, C. J.; VAN DE WIJGERT, J. H. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, p. 862-874, 2010.

VERHOEVEN, V.; BAAY, M.; WEYLER, J.; AVONTS, D.; LARDON, F.; VAN ROYEN, P.; VERMORKEN, J. B. Concomitant *Chlamydia trachomatis* and human papilloma virus infection cannot be attributed solely to sexual behaviour. **European Journal Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, p.735-737, 2004.

VESPA, N. J.; Vacina Quadrivalente contra HPV 6,11, 16, 18: a mais nova ferramenta de prevenção. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, p. 220-223, 2006.

VICKERS, D. M.; OSGOOD, N. D. Current crisis or artifact of surveillance: insights into rebound chlamydia rates from dynamic modelling. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 70, p. 1-10, 2010.

VILLA, L. L.; DENNY, L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, Suppl 1, (S71-S80), 2006.

VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R.; WHEELER, C. M.; KOUTSKY, L. A.; MALM, C.; LEHTINEN, M.; SKJELDESTAD, F. E.; OLSSON, S.

E.; STEINWALL, M.; BROWN, D. R.; KURMAN, R. J.; RONNETT, B. M.; STOLER, M. H.; FERENCZY, A.; HARPER, D. M.; TAMMS, G. M.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F. J.; JANSEN, K. U.; ESSER, M. T.; SINGS, H. L.; SAAH, A. J.; BARR, E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6,11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in Young women: a randomised double-blind placebo controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncology**, v. 6, p. 271-78, 2005.

VODSTRCIL, L. A.; FAIRLEY, C. K.; FEHLER, G.; LESLIE, D.; WALKER, J.; BRADSHAW, C. S.; HOCKING, J. S. Trends in chlamydia ad gonorrhea positivty among heterosexual men and men who have sex with menattending a large urban sexual health service in Australia, 2002-2009. *BCM Infectious Diseases*, v. 11, n. 158, p. 1-10, 2011.

VRANIC, S. M. *Chlamydia trachomatis* Infections of the Adults. In: MALLA, N. **Sexually Transmitted Infections**. Ed. Intech, 2012, p. 31-46. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/sexually-transmitted-infections/chlamydia-trachomatis-infections-of-theadults>.

WALLIN, K. L.; WIKLUND, F.; LUOSTARINEN, T.; ANGSTRÖM, T.; ANTTILA, T.; BERGMAN, F.; HALLMANS, G.; IKÄHEIMO, I.; KOSKELA, P.; LEHTINEN, M.; STENDAHL, U.; PAAVONEN, J.; DILLNER, J. A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinoma. **International journal of câncer**, v. 101, p. 371–374, 2002.

WANG, J. L.; ZHENG, B.-Y.; LI, X.-D.; ANGSTRÖM, T.; LINDSTRÖM, M.S.; WALLIN, K.-L. Predictive significance of the alterations of p16INK4A,p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progres-sion of cervical cancer. **Clinical cancer research**, v. 10, p. 2407-2414, 2004.

WANG, K. L. Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer. **Taiwanese journal of obstetrics & gynecology**, v. 46, p. 352–362, 2007.

WESTROM, L.; JOESOEUF, R.; REYNOLDS, G.; HAGDU, A.; THOMPSON, S. E.; Pelvic inflammatory disease and fertility: a cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657

control women with normal laparoscopic results. **Sexually transmitted diseases**, v. 19, n. 4, p. 185-192, 1992.

WHEELER, C. M. The Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infections and Cervical Cancer: Gaps in Knowledge and Future Horizons. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 40, p. 165-176, 2013.

WHO - World Health Organization Task Force on the Prevention and Management of Infertility Tubal infertility: serologic relationship to past chlamydial and gonococcal infection. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 22, n. 2, p. 71-77, 1995.

WHO - World Health Organization. **Sexually transmitted and other reproductive tract infections**. 2005a. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241592656.pdf?ua=1>>. Acesso em 14 de dezembro de 2013.

WHO - World Health Organization. **Sexually transmitted and other reproductive tract infections: A guide to essential practice**. 2005b. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241592656.pdf>. Acesso em 09 de outubro de 2013a.

WHO - World Health Organization. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer** (2013). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acesso em 02 de outubro de 2013b.

WHO- World Health Organization. **Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates**. Geneva: WHO; 2001. Disponível em: http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf. Acesso em 15 de dezembro de 2013c.

WHO- World Health Organization. **Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections**, p.20, 2012.

WHO. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses, v. 90. (2007). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>> Acesso em 22 dez. 2013.

WIESENFELD, H. C.; SWEET, R. L.; NESS, R. B.; KROHN, M. A.; AMORTEGUI, A. J.; HILLIER, S. L. Comparison of acute and subclinical pelvic inflammatory disease. **Sexually transmitted diseases**, v. 32, n. 7, p. 400-405, 2005.

WILD, D. The Immunoassay Handbook. 3th edition. San Diego, CA, USA: Elsevier Ltd., 2005. 930p.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV Infection: unresolved issues. **Nature Reviews – Cancer**, v. 7, p.11-22, 2007.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S.; WINTER, H.; BAILEY, A.; ELLIS, J.; PRIOR, P.; YATES, M.; ROLLASON, T. P; YOUNG, L. S. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. **Lancet**, v. 357, n. 9271, p. 1831–1836, 2001.

XIA, Q. F.; XU, S. X.; WANG, D. S.; WEN, Y. A.; XI, Q. S. ; ZHAN, Z. L.; WANG, H. M.; LIN, Y. Z.; TU, Z. G. Development of a novel quantitative real-time assay using duplex scorpion primer for detection of Chlamydia trachomatis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 83,p. 119-124, 2007.

ZAMITH, R.; SARTORI, M. G. F.; GIRÃO, J. B. C. Clamídias e Micoplasmas. In: **Patologia do Trato Genital Inferior**. São Paulo: Roca Ltda, 2005.

ZAULI, D. A.; MENESES, C. L.; OLIVEIRA, C. L. Development and padronization of three multiplex PCRs for the diagnosis of Chlamydia trachomatis, Toxoplasma gondii, herpes simplex viruses 1 and 2, and Cytomegalovirus. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 3, p.1004-1009, 2013.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: form basic studies to clinical application. **Nature Reviews**, v. 2, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation oh human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, p. 260-265, 2009.

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **Deteção do HPV e *Chlamydia trachomatis* em amostras de cérvix uterina do estado de Santa Catarina**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com o seu médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

O presente estudo está sob a coordenação da Professora Maria Luiza Bazzo, tendo como pesquisadora principal, a Farmacêutica Bioquímica Lisléia Golfetto como parte de seu trabalho de Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas - CCS) pela Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação da Professora Maria Luiza Bazzo da UFSC. O objetivo desta pesquisa é estudar a aplicabilidade do método molecular RFLP para a identificação do HPV em isolados clínicos de mulheres do estado de Santa Catarina e correlacionar a incidência do vírus com a coinfeção por *Chlamydia trachomatis*. Evidências moleculares e epidemiológicas indicam claramente que certos tipos de HPV são a principal causa de câncer cervical. 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. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) será utilizada para deteção do DNA do HPV e do DNA da *Clamydia trachomatis*. As amostras positivas para HPV serão submetidas à Técnica de Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) para a tipagem do HPV. Os resultados das técnicas moleculares serão associados ao Exame Citológico (Papanicolau).

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe a você decidir se irá ou não participar. Mesmo que você não queira participar do estudo, isso não acarretará nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que você tem direito de receber. Caso decida participar, você irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que você irá receber. Sua participação poderá ser interrompida sem o seu consentimento caso você se torne ineligiável (não ter certas características para continuar no estudo). Ocorrendo esta situação, você será imediatamente informado.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

O pesquisador poderá analisar seu prontuário médico a fim de obter dados referentes ao seu exame citológico, o exame preventivo do câncer do colo do útero. Os dados obtidos serão armazenados pelo pesquisador.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Não haverá nenhum desconforto, pois você não necessitará fazer nenhuma atividade fora de sua rotina. As amostras serão coletadas no momento da realização do exame preventivo, onde é realizado raspado do colo do útero com espátula de Ayre e escova cervical. Simultaneamente, será utilizada a mesma amostra, sendo dividida em duas partes: esfregaço para o exame preventivo (Papanicolaou) e suspensão de células para PCR. Não haverá nenhuma coleta de amostra adicional àquela já prevista na rotina do Exame Ginecológico.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO SERÃO UTILIZADOS OS DADOS PESSOAIS DA SENHORA?

Informo que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente dos pesquisadores e orientador desta pesquisa. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os

possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico será anônima e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que você poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TERÃO SE PARTICIPAR?

Por ser voluntária e sem interesse financeiro, você não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

A senhora estará participando de uma pesquisa que poderá contribuir no diagnóstico precoce do câncer cervical em pacientes atendidas pelo Serviço de Saúde Pública, as quais têm pouco acesso a um diagnóstico mais preciso. O diagnóstico precoce das lesões cervicais juntamente com a identificação dos fatores de risco conduz a melhorias no encaminhamento das pacientes acometidas.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dúvida relacionada ao estudo, ou sempre que você quiser saber sobre os resultados parciais do estudo, por favor, entre em contato com:

Farmacêutica Bioquímica Lisléia Golfetto. Telefone: (48) 37218148 ou (48) 99189125 Email: licagolfetto@gmail.com

Professora Doutora Maria Luiza Bazzo
Telefone: (48) 3721.8081 ou (48) 99728718

Se tiverem dúvidas sobre seus direitos, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO

Eu, _____
recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa. Tive a oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo. Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos ser utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura da pessoa que aplicou este termo

Nome da pessoa que aplicou este termo

Florianópolis, _____ de _____ de 2011.

Assinatura do paciente

Nome do paciente

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2155

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2155 **FR:** 442467

TÍTULO: Detecção do HPV e Chlamydia trachomatis em amostras de cérvix uterina de mulheres do Estado de Santa Catarina

AUTOR: Maria Luiza Bazzo, Lisléia Golfeto, Tomi Ricardo Martins, Thais Cristine Marques Sincero

FLORIANÓPOLIS, 31 de Outubro de 2011.

Coordenador do CEPSH UFSC