



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CO-INFECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E *Chlamydia trachomatis* EM MULHERES COM CITOLOGIA NORMAL E ALTERADA

ÉVELYN COSTA LIRA

**MANAUS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ÉVELYN COSTA LIRA

CO-INFECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E *Chlamydia trachomatis* EM MULHERES COM CITOLOGIA NORMAL E ALTERADA

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas** como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Promoção da Saúde na Amazônia e linha de pesquisa Diagnóstico Epidemiológico Clínico e/ou Laboratorial.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos
Co-orientadora: Prof^ª. MSc. Júnia Raquel Dutra Ferreira

**MANAUS
2010**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

L768c Lira, Évelyn Costa
Co-infecção do papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* em
mulheres com citologia normal e alterada / Évelyn Costa Lira. - Manaus,
AM : UFAM, 2010.
122 f. : il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração:
Promoção da Saúde na Amazônia. Linha de pesquisa: Diagnóstico
Epidemiológico Clínico e/ou Laboratorial). Universidade Federal do
Amazonas. Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos.

1. Microbiologia médica 2. Papilomavírus – Diagnóstico molecular
3. *Chlamydia trachomatis* – Diagnóstico molecular I. Santos, Cristina
Maria Borborema dos (Orient.) II. Título

CDU (2007): 579.61(043.3)

ÉVELYN COSTA LIRA

CO-INFECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E *Chlamydia trachomatis* EM MULHERES COM CITOLOGIA NORMAL E ALTERADA

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas** como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Promoção da Saúde na Amazônia e linha de pesquisa Diagnóstico Epidemiológico Clínico e/ou Laboratorial.

Aprovada em 10 de dezembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa
Universidade Federal do Amazonas

Prfa. Dra. Adele Schwartz Benzaquen
Fundação Alfredo da Matta

Dedico esta dissertação...

a minha avó Mariza,

aos meus pais Carlos e Sheylla,

aos meus irmãos Cristyane e André,

ao meu marido Erick.



AGRADECIMENTOS

A Deus, Ele que é o Criador de todas as coisas, por ter me dado a vontade e o realizar, por providenciar cada momento, cada passo, antes mesmo de eu existir, por permitir o sofrimento e morte de Seu Filho para eu tivesse livre acesso a Ele, livre acesso a uma vida verdadeira, não longe de sofrimentos e tristezas, mas certa de que eu posso ultrapassar qualquer obstáculo. A Ele a honra, a glória e todo o louvor.

Ao meu marido Erick, por ser meu melhor amigo, pelo amor, paciência, compreensão e até mesmo pelo silêncio nas horas mais oportunas, por me entender e me incentivar a ir mais além.

Aos meus pais e irmãos pelo sustento, pelo apoio, pela presença (fosse de perto ou longe). Vocês foram e são essenciais em minha formação como pessoa e como profissional.

A Professora Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, minha orientadora, pela presença, amizade, confiança, respeito e carinho. Pela eterna disposição em assumir responsabilidades, preocupações e aflições e sempre fazer o melhor. Sua orientação vai muito mais além do que o mero profissionalismo, é sentimento, é prazer em fazer e ser Ciência, com humildade e singeleza de coração.

A minha co-orientadora MSc. Júnia Raquel Dutra Ferreira por, mesmo de longe, tentar estar perto e se fazer presente em discussões, sugestões e conselhos essenciais.

A Policlínica Castelo Branco, sob direção da enfermeira Sandra Alves Paes Leme, a enfermeira Antônia Feitosa e as técnicas Elizabeth Negreiros, Maria de Nazaré Teles e Maria Rosa pelo carinho imensurável ao me recepcionar com tanta disponibilidade.

As pacientes, sem as quais não seria possível a realização deste estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Diagnóstico Molecular André Santos, Norma Suely, Daniele Albuquerque, Roberto Alves, Jéssica Mathias e Mayara Vilela, meus dias não

seriam os mesmos sem vocês, este trabalho, o nosso grupo. Acredito muito em nosso desenvolvimento e me coloco à disposição de vocês em tudo. Que possamos crescer a cada dia como a verdadeira família que somos.

Ao Professor Dr. Spartaco Astolfi Filho e aos amigos do Centro Multidisciplinar de Apoio, Enedina Assunção, Jonso Vieira, Anita, Edson, Rogério, Elza, Lívio, pelo falar, pelo ouvir, pelo ensinar e compreender, cada um com suas individualidades. Vocês são peças fundamentais em meu crescimento e conhecimento.

A Universidade Federal do Amazonas, através do Programa de Pós Graduação - Mestrado em Ciências da Saúde, pela oportunidade.

A FAPEAM, pelo auxílio financeiro.

A Professora Dra. Cíntia Mara e Heline Lira, pela disposição em servir e ensinar.

A Professora Dra. Izeni Pires e Mário Nunes, por compartilharem seus conhecimentos em humildade e simplicidade.

A Professora Dra. Maria Ivanilde e Ana Paula por sua paciência em ouvir, pensar, criticar e transmitir, através de um mundo como o da estatística, durante as análises estatísticas dos resultados deste estudo.

A Samanta Sevalho e Marcos Valério pelo companheirismo, amizade e a importante colaboração neste trabalho. Espero poder retribuir sempre por sua disposição.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte dos meus momentos de angústia para que tudo desse certo, na hora certa. Vocês são muito especiais e fazem parte dessa jornada. Muito obrigada pelos sorrisos, lágrimas, pelas chamadas de atenção, pelo encorajamento e pelo entendimento. Obrigada porque eu pude e posso contar com vocês.

“Dá-me, ó Senhor, um coração constante, que nenhuma paixão não merecida possa enfraquecer; dá-me um coração indomado, que nenhuma tribulação possa consumir; dá-me um coração justo, que nenhum propósito imérito possa corromper.”

Tomás de Aquino



RESUMO

O câncer de colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo inteiro. Para o Brasil, o número de novos casos esperados, em 2010, é de 18.430. Na região Norte é o mais incidente. Um dos fatores mais importantes para o surgimento deste tipo de câncer é a presença da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Sozinho, este vírus não pode levar à carcinogênese. Alguns estudos sugerem a presença da *Chlamydia trachomatis* como co-fator em seu desenvolvimento. Este estudo teve como objetivo investigar a co-infecção de HPV e *C. trachomatis* em amostras cervicais com citologia normal e alterada. Trata-se de um estudo transversal, onde foram utilizados dois grupos: o GRUPO I, constituído de 152 mulheres que apresentaram lesões pré-malignas e malignas do colo do útero e o GRUPO II, constituído de 164 mulheres que apresentaram citologia inflamatória. A co-infecção HPV/*C. trachomatis* foi detectada através da PCR e os tipos de HPV foram identificados via seqüenciamento. Foi encontrada co-infecção em 27,1% (41/152) das mulheres do GRUPO I e em 3,75% das mulheres do GRUPO II. A associação entre a co-infecção e os fatores sócio-econômicos-ambientais e clínicos foi observada apenas para a variável “Tipo de HPV” ($p=0,0424$) que associa o HPV 16 a 64,1% das mulheres co-infectadas.

Palavras-Chave: DST, Co-infecção, HPV, *C. trachomatis*, *Nested-PCR*.

ABSTRACT

The cervical cancer is the second most common type of cancer between women worldwide. In Brazil, 18.430 new cases of the disease are expected through 2010. Its incidence is greater in the North region. One of the most crucial factors to the spawning of this kind of cancer is the presence of an infection caused by the HPV (Human Papillomavirus). By itself, this virus can't lead to carcinogenesis. Some studies suggest the presence of *Chlamydia trachomatis* as a co-factor in its development. This study's goal was to investigate the co-infection of HPV and *C. trachomatis* in cervical samples with normal and altered cell biologies. Its consisted of a transversal study, where two groups were applied: GROUP I, made of 152 women who showed pre-malignant and malignant cervical injuries, and GROUP II, of 164 women who showed inflammatory cell biology. The HPV/*C. trachomatis* co-infection was detected through PCR and the two HPV types were detected by sequencing. Co-infection was found in 27,1% (41/152) of women in GROUP I and 3,75% in GROUP II's. The connection between the co-infection and the environmental, socio-economic and clinical factors was observed only to the variable "HPV type" ($p=0,0424$) which associates HPV 16 to 64,1% of co-infected women.

Keywords: STI, Co-infection, HPV, *C. trachomatis*, Nested-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo Tridimensional do Papilomavírus Humano (HPV).....	23
Figura 2 -	Genoma do HPV-16	24
Figura 3 -	Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
Figura 4 -	Fluxo de Procedimentos para o GRUPO I	46
Figura 5 -	Fluxo de Procedimentos realizados para o GRUPO II	46
Figura 6 -	Fluxograma mostrando as etapas a serem realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM	47
Figura 7 -	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 241 pb, utilizando-se dos iniciadores KL1/KL2 (MAHONY et al., 1993)	63
Figura 8 -	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 270pb correspondente a amplificação de uma região microssatélite (GATA) ₁₃ do cromossoma 15 humano, utilizando-se dos iniciadores ISO5G (PONTES et a.l., 2003)	70
Figura 9 -	Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 450 pb correspondente a amplificação da região L1 do capsídeo viral, utilizando-se dos iniciadores MY09/MY11 (BAUER; MANOS, 1998)	71
Figura 10 -	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 150 pb correspondente à segunda etapa de amplificação da região L1 do capsídeo viral mais interna, utilizando-se dos iniciadores GP5+/GP6+ (BAUER; MANOS, 1998)	71
Figura 11 -	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 241 pb correspondente à amplificação, utilizando-se dos iniciadores KL1/KL2 (MAHONY et al., 1993)	73
Figura 12 -	Boxplot da variável “Idade da 1ª relação sexual” entre os GRUPOS	77
Figura 13 -	Boxplot da variável "Idade da 1ª gestação" entre os GRUPOS	77
Figura 14 -	Boxplot da variável "Nº de partos normais" entre os GRUPOS	78
Figura 15 -	Boxplot da variável "Nº de partos cesáreos" entre os GRUPOS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições da amplificação controle de DNA	49
Tabela 2 -	Condições da amplificação para diagnóstico do HPV	50
Tabela 3 -	Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico de HPV e tamanhos dos produtos obtidos	52
Tabela 4 -	Condições para a Reação de seqüenciamento	54
Tabela 5 -	Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para o diagnóstico de <i>C. trachomatis</i> e tamanho do produto obtido	55
Tabela 6 -	Condições da amplificação para diagnóstico da <i>C. trachomatis</i>	56
Tabela 7 -	Perfil sócio-econômico do GRUPO I	59
Tabela 8 -	Perfil clínico do GRUPO I	60
Tabela 9 -	Perfil clínico do GRUPO I (cont.)	60
Tabela 10 -	Distribuição das variáveis de acordo com a co-infecção por HPV e <i>C. trachomatis</i> no GRUPO I	64
Tabela 11 -	Distribuição das variáveis clínicas do GRUPO I de acordo com a co-infecção por HPV e <i>C. trachomatis</i>	65
Tabela 12 -	Relação co-infecção x HPV x lesão	66
Tabela 13 -	Perfil sócio-econômico do GRUPO II	67
Tabela 14 -	Perfil clínico do GRUPO II	68
Tabela 15 -	Perfil clínico do GRUPO II (cont.)	69
Tabela 16 -	Comparação entre as variáveis dos GRUPOS I e II	74
Tabela 17 -	Comparação das variáveis clínicas entres os GRUPOS I e II	76
Tabela 18 -	Comparação das variáveis clínicas entres os GRUPOS I e II (cont.)	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição do GRUPO I em relação ao tipo de lesão do colo do útero	58
Gráfico 2 -	Tipos de HPV encontrados no GRUPO I	61
Gráfico 3 -	Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a lesão encontrada	62
Gráfico 4 -	Tipos de HPV encontrados no GRUPO II	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Amazonas
ASC	Células escamosas atípicas
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
ASC-H	Células escamosas atípicas em que não é possível se excluir uma lesão de alto grau
ATP	Adenosina trifosfato
CAM	Centro de Apoio Multidisciplinar
CDC	Centro de Controle de Doenças
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
E	Região Precoce, do inglês, <i>Early Region</i>
EB	Corpos elementares
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EIA	Enzimaimunoensaio
FCECON-AM	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau, do inglês, <i>high squamous intra-epithelial lesions</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
L	Região Tardia, do inglês, <i>Late Region</i>
LCR	Região Longa de Controle, do inglês, <i>Long control region</i>
LPS	Antígeno lipopolissacarídico
LSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, do inglês, <i>low squamous intra-epithelial lesions</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

MHC	Moléculas de histocompatibilidade, do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mM	Milimolar
MOMP	Proteína de membrana externa principal, do inglês, <i>Major outer membrane protein</i>
NIC	Neoplasia Intra-epitelial Cervical
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reação em cadeia da Polimerase, do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pRB	Proteína de susceptibilidade do retinoblastoma
pb	Pares de base
Pmol	Picomol
p53	Proteína supressora tumoral
RB	Corpos reticulares
RNA	Ácido ribonucléico
SIL	Lesões Intra-epiteliais escamosas, do inglês, <i>squamous intra-epithelial lesions</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Solução Tampão: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM
TEB	Solução Tampão: Tris Borato + EDTA
TGF-α	fator do crescimento transformante alfa
TPK	Tampão de Lise: 900 μ L de TE + 100 μ L de Tween 20 a 20% + 20 μ L de proteinase K a 10 mg/mL
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
URR	Região longa de controle, do inglês, <i>Upstream regulatory region</i> ou LCR, do inglês, <i>long control region</i>
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Câncer de Colo do Útero	18
1.1.1 Lesões Intra-epiteliais Escamosas	19
1.2 Papilomavírus Humano (HPV)	22
1.2.1 Ciclo de Desenvolvimento e Oncogênese	26
1.2.2 Diagnóstico do HPV	28
1.3 Fatores de Risco para o Desenvolvimento do Câncer de Colo do Útero	31
1.4 <i>Chlamydia trachomatis</i>	33
1.4.1 Ciclo de desenvolvimento da <i>C. trachomatis</i>	35
1.4.2 Diagnóstico da <i>C. trachomatis</i>	37
1.5 Co-infecção do HPV e <i>C. trachomatis</i>	39
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Geral.....	42
2.2 Específicos.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Modelo de Estudo.....	43
3.2 Universo de Estudo	43
3.2.1 População de Estudo	43
3.2.2 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão	44
3.2.2.1 Critérios de Inclusão para as mulheres atendidas na FCECON-AM	44
3.2.2.2 Critérios de Inclusão para as mulheres atendidas na Policlínica Castelo Branco	44
3.2.2.3 Critérios de Exclusão para as mulheres atendidas no FCECON-AM e na Policlínica Castelo Branco	45
3.2.3 Amostra	45
3.3 Fluxo de Procedimentos	46
3.3.1 GRUPO I	46
3.3.2 GRUPO II	46
3.4 Detalhamento dos Procedimentos	47
3.4.1 Coleta	47

3.4.2 Diagnóstico Molecular do HPV e <i>C. trachomatis</i>	48
3.4.2.1 Extração do DNA do HPV e <i>C. trachomatis</i>	48
3.4.2.2 Amplificação do Controle do DNA	48
3.4.2.3 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico do HPV	50
3.4.2.4 Purificação do Produto Amplificado	53
3.4.2.5 Reação de Sequenciamento	53
3.4.2.6 Precipitação do Produto da Reação de Sequenciamento	54
3.4.2.7 Análise das Sequências	54
3.4.2.8 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico da <i>C. trachomatis</i>	55
3.5 Análise Estatística dos Resultados	56
4. RESULTADOS	58
4.1 GRUPO I	58
4.1.1 Características do GRUPO I	58
4.1.2 Procedimentos Moleculares (GRUPO I)	61
4.1.3 Co-infecção x Fatores sócio-econômicos-ambientais e clínicos	63
4.2 GRUPO II	66
4.2.1 Características do GRUPO II	67
4.2.2 Procedimentos Moleculares (GRUPO II)	69
4.3 Análise Estatística (GRUPO I e GRUPO II)	74
5. DISCUSSÃO	82
5.1 Fatores de Risco	83
5.2 Infecção por HPV	86
5.3 Infecção por <i>C. trachomatis</i>	90
5.4 Co-infecção por HPV e <i>C. trachomatis</i>	92
6. CONCLUSÕES	95
BIBLIOGRAFIA	97
APÊNDICES	111
ANEXOS	118

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) têm sido consideradas um grave problema de Saúde Pública por sua magnitude, pela dificuldade de identificação de seus sintomas e, principalmente, por serem o principal fator facilitador da transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Complicações potencialmente graves como o risco de infertilidade, abortos, natimortalidades e infecções congênitas, também estão relacionados a essas doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Segundo WHO – World Health Organization (2010b) e Ministério da Saúde (2006b), a década de 90 foi finalizada com uma estimativa anual que totalizava em 340 milhões de novos casos de DST por ano no mundo todo, destes, 10 a 12 milhões, apenas no Brasil.

O Papilomavírus Humano (HPV) e a *Chlamydia trachomatis* são DST que infectam o trato genital. São capazes de causar lesões, tanto benignas quanto malignas (PEREZ, 2001).

A infecção pelo HPV tem sido considerada condição necessária para os casos de câncer de colo do útero. No entanto, sendo esta uma doença multifatorial, fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos estão envolvidos em adição ao HPV (STANLEY, 2003; PSYRRI; DIMAIO, 2008; INCA, 2010a; WHO, 2010a).

O Ministério da Saúde (2006c) relata o fato de que mulheres com DST apresentam lesões precursoras do câncer de colo do útero cinco vezes mais do que aquelas que não possuem alguma DST. E, ainda, que essas mulheres têm maior risco para desenvolver o câncer de colo do útero quando portadoras do HPV.

Diversos estudos têm considerado a *C. trachomatis* como um co-fator no desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e outras alterações celulares significativas em mulheres com história de infecção por HPV (TAMIM et al., 2002; SMITH et al., 2002b; FINAN et al., 2002; SCHIFFMAN; KJAER, 2003; MUÑOZ et al., 2006).

No Brasil, um dos maiores problemas enfrentados pelos profissionais da área de saúde tem sido o diagnóstico laboratorial dessas doenças, pois os testes para diagnósticos não se encontram disponíveis na rede pública de saúde. Raras são as unidades de saúde habilitadas para oferecer resultados conclusivos e confiáveis e estas estão, quase sempre, atreladas a projetos de pesquisa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

É comum o fato de que mulheres com DST sejam submetidas à citopatologia mais frequentemente devido ao maior risco de serem portadoras do câncer de colo do útero ou de seus precursores. No entanto, o exame preventivo não tem o objetivo de identificar DST, embora muitas vezes, seja possível a identificação do agente ou de efeitos citopáticos sugestivos da presença dos mesmos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006c).

Sankaranarayanan et al. (2004) destacam que o rastreamento citológico não é infalível. A sensibilidade de um único teste está em torno de 40-65% e varia dependendo dos diferentes locais de coleta. Para compensar esta falta de sensibilidade, o exame é repetido diversas vezes durante a vida da mulher.

A utilização de um teste diagnóstico para o HPV poderia aumentar a sensibilidade do rastreamento cervical, já que a sensibilidade de um resultado HPV positivo é, significativamente, mais elevada do que aquela de um único teste citológico (CUZICK et al., 2006).

Nos Estados Unidos já tem sido concedida a aprovação pela *Food and Drug Administration* (Agência de Medicamentos e Alimentos) para o uso do teste diagnóstico para o HPV em combinação com o teste citológico no rastreamento em mulheres acima de 30 anos de idade e para a triagem de esfregaços com lesões de baixo grau. Esta prática clínica está em fase inicial, também, no continente europeu (CUSCHIERI et al., 2006).

No Brasil, a prática de técnicas de diagnósticos combinadas ao teste citológico ainda é pouco explorada. Ainda que existam estudos mostrando a prevalência dessas doenças nas

diferentes regiões do país e do mundo, torna-se difícil a comparação desses dados devido aos diversos testes diagnósticos utilizados e às amostras populacionais não comparáveis. É extremamente necessário que se faça o levantamento da real situação em relação às DST, para que possa haver o desenvolvimento esperado em relação ao seu controle (FERNANDES et al., 2010).

Foi diante desse panorama que se verificou a necessidade de investigar a co-infecção pelo HPV e *C. trachomatis* em mulheres que apresentaram citopatológico normal ou com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero atendidas pelo serviço público da cidade de Manaus (AM), além de analisar as variáveis biológicas, demográficas, hábitos e características clínico-ginecológicas associadas a esta co-infecção.

1.1 Câncer de Colo do Útero

O câncer de colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo inteiro. Essa doença chega a matar mais de 288.000 mulheres por ano (WHO, 2010a; IARC, 2010a).

São estimados 500.000 novos casos por ano, sendo que mais de 80% ocorrem nos países em desenvolvimento. O número de novos casos de câncer de colo do útero esperado para o Brasil em 2010 é de 18.430, com um risco estimado de 18 casos a cada 100.000 mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo do útero é o mais incidente na região Norte (23/100.000). Nas regiões Nordeste (18/100.000) e Centro-Oeste (19/100.000) ocupa a segunda posição mais freqüente e nas regiões Sul (24/100.000) e Sudeste (18/100.000), a terceira posição (SHANTA et al., 2000; INCA, 2010a; WHO, 2010a).

A incidência do câncer de colo do útero é quase duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparados aos países mais desenvolvidos. No entanto, nos Estados

Unidos, 11.069 mulheres foram acometidas pelo câncer de colo do útero, em 2008 e 3.869 mulheres morreram devido a esta doença. Neste mesmo país é estimado um investimento de dois bilhões de dólares por ano no tratamento do câncer de colo do útero (BROWN et al., 2001; UNITED STATES, 2007; IARC, 2010b)

Evidências epidemiológicas e moleculares indicam certos tipos de HPV como alguns dos principais fatores epidemiológicos incluídos como causas do câncer cervical invasivo e sua relação em 99,7% dos casos de carcinoma cervical no mundo todo (WALBOOMERS et al., 1999; BOSCH et al., 2002; INCA, 2010a).

Sabe-se que, mais de 100 tipos de HPV já foram identificados, através da análise de seqüência do DNA, sendo que 85 já foram muito bem caracterizados. Destes, cerca de 40 tipos diferentes infectam o trato anogenital e, pelo menos 20 estão diretamente associados ao câncer de colo do útero (MUÑOZ et al., 2003; DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005; PSYRRI; DIMAIO, 2008; WHO, 2010a).

Os HPV genitais podem infectar o epitélio escamoso e as membranas mucosas da cérvix, da vagina, da vulva, do pênis e da região perianal, podendo induzir ao aparecimento de verrugas anogenitais (condiloma acuminado), lesões intra-epiteliais escamosas de baixo e alto grau (pré-cancerosas) ou até mesmo cânceres (BURD, 2003).

1.1.1 Lesões Intra-epiteliais Escamosas

As lesões intra-epiteliais escamosas (*squamous intra-epithelial lesions* – SIL) são lesões precursoras do câncer de colo do útero. São classificadas, dependendo do grau de perda da diferenciação epitelial, em alto ou baixo grau e, geralmente, provocam alterações morfológicas características, detectáveis pela citologia dos raspados cérvico-vaginais e histopatologia (WOLSCHICK, 2007).

A nomenclatura para emissão de laudos citopatológicos aceita, atualmente, no âmbito internacional é o Sistema Bethesda 2001, que classifica as anormalidades de células epiteliais escamosas em quatro categorias (JANICEK; AVERETTE, 2001; BURD, 2003):

- Células escamosas atípicas (ASC), subdividida em duas subcategorias:
 - Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), abrangendo lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (*low squamous intra-epithelial lesions* - LSIL) e SIL de grau indeterminado;
 - Células escamosas atípicas em que não é possível se excluir uma lesão-intraepitelial escamosa de alto grau (*high squamous intra-epithelial lesions* - HSIL ou ASC-H);

- LSIL, que abrange alterações celulares causadas pelo HPV tais como coilocitose acompanhada de discariose leve;

- HSIL, que abrange displasia moderada, severa e carcinoma *in situ*;

- Carcinoma de células escamosas.

A Nomenclatura Brasileira para Laudos Citológicos sofreu algumas alterações a partir da atualização do Sistema Bethesda, em 2001, quando houve a necessidade de incorporar as novas tecnologias e conhecimentos clínicos, morfológicos e moleculares. Dentre estas alterações, é destacada a similaridade desta Nomenclatura com o Sistema Bethesda, facilitando a equiparação dos resultados nacionais com aqueles encontrados nas publicações

científicas internacionais. Sendo assim, a classificação é a seguinte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a):

Células Atípicas de significado indeterminado

- Escamosas:
 - Possivelmente não-malignas;
 - Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.
- Glandulares:
 - Possivelmente não-malignas;
 - Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.
- De origem indefinida:
 - Possivelmente não-malignas;
 - Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.

Atípias Celulares em Células Escamosas

- Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I ou NIC I);
- Lesão intra-epitelial de alto grau (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais grau II e III ou NIC II e NIC III, respectivamente);
- Lesão intra-epitelial de alto grau, não podendo excluir microinvasão;
- Carcinoma epidermóide invasor.

Atípias Celulares em Células Glandulares

- Adenocarcinoma in situ;
- Adenocarcinoma invasor: Cervical, Endometrial, Sem outras especificações.

1.2 Papilomavírus Humano (HPV)

O Papilomavírus Humano (HPV) pertence ao gênero *Papillomavirus* e à família *Papillomaviridae*. Estes vírus são caracterizados por apresentarem genoma circular constituído de dupla fita de DNA com, aproximadamente, 8.000 pares de base (pb) envolvidos por uma capa protéica, o capsídeo que, por sua vez, é icosaédrico e possui as proteínas L1 e L2 organizadas em 72 capsômeros. São pequenos vírus não-envelopados com diâmetro em torno de 55nm (FIGURA 1) (RIVOIRE, 2001; CAMARA, et al., 2003a; DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005; MOODLY; LAIMINS, 2010).

De acordo com Bernard et al. (1994) e Burd (2003), o genoma da partícula viral é funcionalmente dividido em 3 regiões. A primeira é a região não codificadora (*upstream regulatory region* – URR ou *long control region* - LCR). Esta região contém o promotor p97 e seqüências *enhancer* e *silencer* que regulam a replicação do DNA pelo controle de transcrição das seqüências *Open Reading Frame* (ORF). A segunda região, a chamada região precoce, do inglês, *early region* (E), consiste das ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão envolvidas na replicação viral e interferem em proteínas que controlam o ciclo celular, conferindo a esses vírus potencial para transformar e imortalizar as células hospedeiras. A terceira região, chamada região tardia, do inglês, *late region* (L), codifica as proteínas L1 e L2, que são proteínas estruturais responsáveis pela imunogenicidade do vírus e determinantes antigênicos gênero-específicos (FIGURA 2).

Os primeiros tipos de HPV foram isolados a, aproximadamente 30 anos atrás (ORTH et al., 1977; zur HAUSEN, 1979).

As primeiras demonstrações da presença do DNA do HPV em carcinoma cervical foram relatadas por Durst et al. (1983) e Boshart et al. (1984).

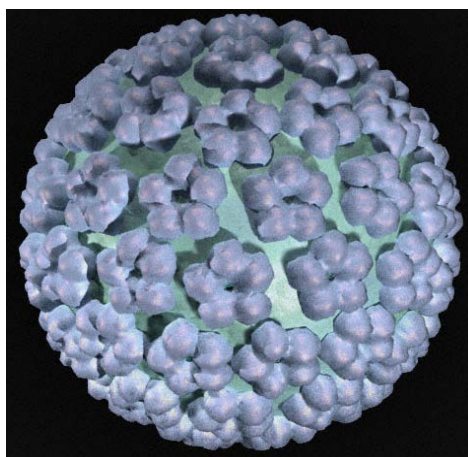


Figura 1: Modelo Tridimensional do Papilomavírus Humano (HPV).
Fonte: <www.med-ars.it> Acesso em: 20/06/2008.

De acordo com seu potencial oncogênico, os diferentes tipos de HPV encontrados nos cânceres cervical e anogenital são classificados como vírus de baixo risco (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) e provável alto risco (HPV-26, 53 e 66) (SETTHEETHAM-ISHIDA et al., 2005; MUÑOZ et al., 2006; BOSCH; SANJOSE, 2007; BURK et al., 2009).

Tanto os tipos oncogênicos como os tipos não oncogênicos de HPV podem causar as lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) ou neoplasia intra-epitelial cervical (NIC 1) da cérvix uterina podendo, ou não, levar ao desenvolvimento do câncer cervical. Os HPV 6 e 11, na maioria das vezes, provocam apenas infecção, e têm como resultado a morte celular. Eles causam a maioria das verrugas genitais, tanto em homens quanto em mulheres. Os HPV 16 e 18, por sua vez, ao invés de levar a morte celular, induzem a sua imortalização, oportunizando assim o processo oncogênico. Estes são responsáveis por cerca de 50 e 20% de todos os casos de câncer cervical no mundo, respectivamente (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; RIVOIRE et al., 2006; SMITH et al., 2007; BURK et al., 2009).

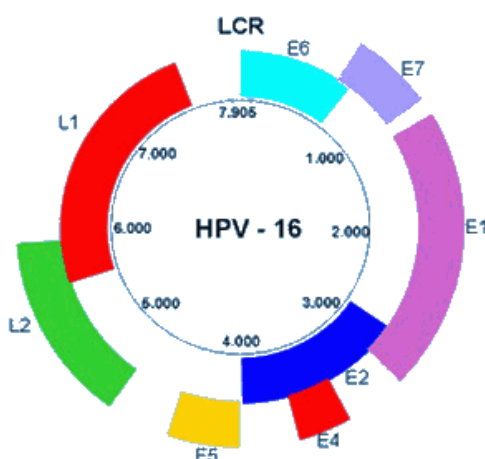


Figura 2: Genoma do HPV 16.

Fonte: <www.ipoporto.min-saude.pt> Acesso em: 10/11/2010.

Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos têm demonstrado que 75 % da população com idade entre 15-50 anos são infectadas com HPV genital durante toda a sua vida, 60% apresentam infecção transitória, 10% apresentam infecção persistente (confirmadas pela detecção do DNA de HPV em amostras genitais), 4% apresentam citologia alterada e 1% apresentam algum tipo de lesão clínica (WHO, 2010a).

No Brasil, estudos têm mostrado que a infecção por HPV é freqüente em mulheres jovens por estarem em plena vida reprodutiva e na fase de maior atividade sexual. Com o aumento da incidência desta infecção em adolescentes sexualmente ativas, o surgimento de lesões intra-epiteliais malignas poderia progredir mais rapidamente devido à imaturidade da cérvix (BRINGHETI et al., 2001; SARIAN et al., 2003; CARNEIRO, et al., 2004; SAMOFF et al., 2005).

Naud et al. (2000) relatam que as taxas de incidência da infecção pelo HPV podem alcançar, aproximadamente, 40% em pacientes com menos de 20 anos. Depois dos 35 anos a prevalência da infecção diminui para até 10% e a infecção pelo HPV de alto risco para,

aproximadamente, 5%. No entanto, enquanto a infecção pelo HPV diminui com a idade, a incidência de câncer cervical aumenta.

No Amazonas, Castro (2002) verificou um percentual de 39,28% de infecção pelo HPV em 83 mulheres atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON), que apresentavam diagnóstico sugestivo para a infecção por HPV, diagnóstico de displasia leve, moderada e acentuada, carcinoma *in situ*, câncer microinvasor, carcinoma francamente invasor e adenocarcinoma de colo uterino contra um percentual de 6,45% em 61 mulheres atendidas no Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), que apresentavam citológico normal ou inflamatório, através da PCR, utilizando os *primers* MY09/MY11.

Em uma análise secundária de dados referentes a um grupo de 1.318 mulheres com idade entre 15-25 anos, coletados em cinco cidades brasileiras (Fortaleza, São Paulo, Campinas, Porto Alegre e Curitiba), Souza (2004) encontrou uma prevalência de infecções por HPV de 38,5%, sendo que, 27,9% por HPV de alto risco. Este autor ressalta, ainda, que a frequência destas infecções em cada uma das cinco cidades foi bastante similar.

De Paula et al. (2007) demonstraram uma prevalência de 40% (100/250) entre mulheres que apresentaram exames citopatológicos normais e alterados, em um estudo realizado em Minas Gerais, utilizando a técnica da PCR. Nos casos de carcinoma (4/250), o DNA de HPV foi detectado. E, quando consideradas apenas as amostras que apresentaram alterações citológicas (ASCUS, LSIL, HSIL e carcinoma invasivo), a infecção por HPV foi detectada em 73,3% (55/75) dos casos.

Pereira et al. (2007) observaram uma prevalência de 75,6% (152/201) de infecções por HPV em um estudo do tipo caso-controle realizado no Rio de Janeiro com mulheres entre 15-81 anos. A positividade para HPV foi encontrada, através da PCR, nas 84 (100%) mulheres que faziam parte do grupo considerado caso, as quais apresentavam HSIL (51/84) e câncer

invasivo (33/84), e em 59% (68/117) das mulheres que faziam parte do grupo considerado controle. Este grupo foi composto de 49 mulheres que apresentaram citológico normal ou inflamatório, 28 mulheres positivas para HPV, 6 mulheres apresentando ASCUS e 34 mulheres apresentando LSIL. Em 25,6% (39/152) das pessoas infectadas foi encontrada uma co-infecção de dois ou três tipos de HPV.

Ferreira (2007), utilizando a técnica da PCR com *primers* MY09/MY11 seguido de *Nested-PCR* com *primers* GP5/GP6, detectou a presença do DNA do HPV em 94,7% das 153 mulheres com diagnóstico de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, atendidas no serviço de Ginecologia da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON – AM) e, posteriormente confirmadas pela histopatologia .

Assim, o HPV surge como um dos principais agentes carcinogênicos ao ser encontrado em cerca de 90% dos cânceres cervicais e por possuir oncogenes (E6 e E7) com potencial de transformação maligna (BRENNAN; SYRJANEN, 2003; SCHIFFMAN; KJAER, 2003).

1.2.1 Ciclo de Desenvolvimento e Oncogênese

A entrada do vírus nas células basais do epitélio escamoso estratificado pode ocorrer seguida por três eventos distintos: No primeiro, o DNA viral é mantido na forma epissomal (circular e não integrado), estabelecendo uma infecção latente, o que geralmente ocorre em lesões de pele benignas. No segundo evento, há a conversão da infecção latente em produtiva e no terceiro evento, o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira, como se dá em lesões malignas, geralmente, associadas aos HPV 16 e 18 (KAUFMAN et al., 2000; BURD, 2003; RIVOIRE et al., 2006; WOLSCHICK et al., 2007; MOODLY; LAIMINS, 2010).

A integração do DNA do HPV ao genoma da célula hospedeira e a subsequente expressão das oncoproteínas E6 e E7 representam, atualmente, dois mecanismos de ativação para a progressão das lesões pré-invasivas ao câncer cervical (WOLSCHICK et al., 2007).

Para integrar-se ao DNA celular, é necessário que haja uma quebra no genoma viral, o que, geralmente ocorre nas regiões E1 e E2. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses genes, acompanhada de uma desregulação da expressão dos genes E6 e E7 (RIVOIRE et al., 2006).

As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 do genoma do HPV, mostram-se diretamente relacionadas com a carcinogênese mediada pelo HPV. Apesar de não ser muito bem esclarecido, é possível que a ação ocorra através da interação de E6 com a proteína p53 (proteína supressora tumoral) e E7 com a proteína pRb (proteína do retinoblastoma), causando uma desregulação do ciclo celular, além de dar início a transformação e imortalização das células infectadas pelo HPV (TANG, 2002; MANDIC; VUJKOV, 2004; RIVOIRE et al., 2006; MOODLY; LAIMINS, 2010).

De acordo com Doorbar (2005), as proteínas p53 e pRb atuam no ciclo celular e exercem papel de regulação no controle da transcrição celular dos genes envolvidos na progressão e na proliferação celular.

A proteína E6 inativa a proteína p53 pela degradação rápida através da via da ubiquitina. A inativação da p53, por sua vez, reduz a chance de células geneticamente danificadas serem eliminadas, iniciando assim um processo carcinogênico (KELLEY et al., 2005; RIVOIRE et al., 2006).

A proteína pRb interage com o fator de transcrição celular E2F, inibindo a transcrição induzida por este fator. Com a ligação da proteína E7 à pRb, ocorre a inativação e, conseqüente, liberação do fator de transcrição E2F do complexo repressor transcricional pRb/E2F, fazendo com que haja a ativação do ciclo celular e a proliferação celular

desregulada (JANICECK; AVERETTE, 2001; DOORBAR, 2005; WOLSCHICK et al., 2007).

Moodly e Laimins (2010) destacam que, mesmo que as proteínas E6 e E7 sejam necessárias para a transformação fenotípica, elas não são suficientes para direcionar uma transformação das células. É preciso que ocorram eventos oncogênicos adicionais para que a progressão maligna possa acontecer, tais como, a instabilidade genômica das células hospedeiras. Esse fato mostra-se consistente com o período de latência entre o início da infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer. No entanto, proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco induzem a instabilidade genômica em células normais, já que uma das principais características desses HPV é induzir a progressão maligna (WHITE et al., 1994; SCHIFFMAN et al., 2007).

1.2.2 Diagnóstico do HPV

A maioria das infecções causadas por HPV é assintomática ou inaparente e de caráter transitório. Suas formas de apresentação podem ser clínicas, apresentando lesões exofíticas ou verrugas, e subclínicas, onde não apresentam lesão aparente (INCA, 2010b).

No Brasil, a presença do DNA de HPV em amostras de pacientes que apresentam SIL e carcinoma invasivo varia de 55,2% a 94,7%, dependendo do método de detecção utilizado (CAVALCANTI et al., 2000; LORENZATO et al., 2000).

As lesões precursoras do câncer de colo do útero, produzidas pelo HPV, podem ser detectadas pelo exame citopatológico (Papanicolaou). Este exame é um método muito útil e difundido mundialmente, que vem sendo considerado a melhor estratégia de Saúde Pública para a triagem de lesões pré-malignas e malignas e, logo, o principal aliado na redução do câncer cervical. No entanto, apresenta limitações com relação à sensibilidade para a detecção

das lesões pré-malignas. É estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade pelo câncer cervical pode ser alcançada através do rastreamento de mulheres na faixa etária de 25-65 anos com o teste Papanicolaou e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ*. Para tanto, é necessário garantir a organização, integralidade do programa de rastreamento, bem como o seguimento das pacientes ao método (BRINGHENTI et al., 2001; JANICEK; AVERETT, 2001; HWANG et al., 2003; JORDÃO et al., 2003; INCA, 2010b).

É sabido que somente 10 a 20% das mulheres HPV-positivas apresentam anormalidades citológicas, sendo essencial a confirmação do diagnóstico pelo uso de técnicas da biologia molecular (GROSS; BARRASSO, 1999). Somente estas técnicas permitem a detecção do DNA do HPV e são capazes de informar ao clínico da existência da infecção mesmo na ausência de alterações morfológicas (SILVA FILHO; LONGATTO FILHO, 2000). Além disso, o diagnóstico molecular do HPV está sendo cotado como método de triagem para identificação de mulheres com risco aumentado para o desenvolvimento do câncer cervical (ARBYN et al., 2004; BAGARELLI; OLLIANI, 2004).

Em estudos prospectivos realizados pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), foi demonstrado que mulheres positivas para o DNA de HPV têm risco maior de desenvolver uma lesão do tipo HSIL do que mulheres HPV-negativas (MUÑOZ et al., 2006).

Winer et al. (2005) demonstraram que, mulheres sem algum tipo de lesão aparente, nas quais foi detectado o HPV 16, desenvolveram lesões dos tipos NIC II e NIC III dois anos após a detecção do DNA do HPV.

Kaneshima et al. (2001) e Bigio et al. (2002) afirmam que os métodos moleculares são os mais sensíveis e tornam as decisões na conduta clínica mais fáceis, pois baseiam-se em critérios objetivos e não em critérios morfológicos de colposcopia.

As principais técnicas, da biologia molecular, utilizadas para a detecção do DNA do HPV são a reação da polimerase em cadeia (PCR) e a captura híbrida (WOLSCHICK, 2007).

O *southern blot* é uma técnica de hibridização utilizada para a detecção do DNA do HPV a partir do DNA de espécimes celulares. É um teste que produz resultados qualitativos ocasionalmente utilizados em experimentos de pesquisa. Não é recomendável para indicações clínicas por ser trabalhoso e requerer amostras frescas (TANG et al., 2002; HWANG et al., 2003).

A captura híbrida é um método de fácil realização aplicado à análise de um grande número de amostras. Detecta o DNA viral presente em materiais cérvico-vaginais, através de múltiplas sondas de RNA, que são capazes de reconhecer seqüências de HPV de baixo e de alto risco, sendo testadas como sonda A e sonda B, respectivamente. Essas sondas podem ser utilizadas em conjunto ou separadamente e a utilização de microplacas permite que o ensaio seja automatizado. No entanto, com exceção dos grupos de alto risco e baixo risco, o método não distingue entre os tipos de HPV (VINCE et al., 2001; RIETHMULLER et al., 2002; BURD, 2003). Além disso, as indicações para a utilização deste método apontam para o auxílio no diagnóstico das infecções por HPV, no que diz respeito à distinção entre infecção com tipos de HPV de baixo e de alto risco; a triagem de paciente com resultado citológico ASC-US, determinando seu encaminhamento para a colposcopia; e auxílio à citologia na avaliação do risco de desenvolvimento do câncer cervical, nos casos de pacientes com resultados de LSIL e HSIL (PARASKEVAIDIS et al., 2001; BURD, 2003).

A PCR é um método que permite a escolha de *primers* específicos para cada tipo (com base nas variações de seqüência presentes nos genes E6 e E7) e possibilita a identificação do genótipo do HPV. Podem, ainda, ser escolhidos, *primers* para regiões conservadas do genoma do HPV como a L1, permitindo a detecção de diferentes tipos de HPV em uma única reação. É o método mais sensível, atualmente (TANG, 2002; BURD, 2003; HWANG et al., 2003).

Para a detecção do HPV são utilizados os *primers* MY09 e MY11 (BAUER; MANOS, 1998) que amplificam um fragmento de 450 pb da região L1 do capsídeo viral. Em um estudo utilizando 153 amostras, Ferreira (2007) detectou uma positividade para HPV em apenas 49 (32%) de suas amostras, utilizando os *primers* MY09/MY11. Com o intuito de aumentar a sensibilidade do diagnóstico nas amostras utilizadas, a pesquisadora utilizou a técnica do *Nested-PCR*, utilizando os *primers* GP5+ e GP6+ (BAUER; MANOS, 1998) localizados internamente à seqüência de nucleotídeos da primeira amplificação (MY09/MY11). Esses *primers* amplificam um fragmento de 150 pb. Através da técnica *Nested-PCR*, a pesquisadora detectou o DNA do HPV em 145 amostras, incluindo as detectadas com MY09/MY11. Utilizando-se apenas a reação com os *primers* MY09/MY11, 96 (95,2%) de suas amostras resultariam em um diagnóstico falso-negativo.

Estes resultados confirmam a necessidade de empregar-se uma técnica mais sensível que aumente a detecção do HPV.

1.3 Fatores de Risco para o Desenvolvimento do Câncer de Colo do Útero

Apesar da infecção pelo HPV ser muito comum, estima-se que menos de 10% das mulheres portadoras de um tipo oncogênico desse vírus eventualmente desenvolverá câncer de colo do útero (INCA, 2010b).

Esse fator somado ao conhecimento de que células infectadas com expressão constante do gene E6 e E7 não se apresentam imortalizadas sugerem que a presença do vírus é necessária, mas não é suficiente para a transformação celular, mostrando haver a existência de moduladores agindo como co-fatores (CAMARA et al., 2003b; BARROS et al., 2007).

O uso prolongado de contraceptivos orais, a multiparidade, o tabagismo, o número de parceiros sexuais e a presença de outras DST, como herpes genital, *Chlamydia trachomatis* e

o HIV têm sido apontados como co-fatores do HPV no surgimento de carcinomas cervicais (SMITH et al., 2002a; SMITH et al., 2003; SMITH et al., 2004; ICESCC, 2006a; ICESCC, 2006b; INCA, 2010b).

Bosch et al. (2002), consideram que o número de parceiros sexuais e a presença de outras DST sejam circunstanciais e não causais, refletindo, assim, medidas indiretas de exposição ao HPV.

De Lima Soares et al. (2003), em um estudo realizado no nordeste brasileiro verificaram que 43,3% dos diagnósticos de infecção por HPV ocorreram simultaneamente com outras DST.

Castellsagué e Muñoz (2003) afirmam que o uso de contraceptivos orais poderia influenciar a progressão da infecção pelo fato de promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição dos genes E6 e E7 envolvidos na carcinogênese. Hildesheim et al. (2001) e Moreno et al. (2002) observaram que, em mulheres positivas para o HPV, havia uma associação entre o uso prolongado de contraceptivos orais (mais de cinco anos) e o câncer cervical. Esta associação pode estar relacionada com o fato de que mulheres que utilizam contraceptivos orais vão ao médico com mais frequência, facilitando assim, o diagnóstico precoce do câncer cervical.

Em estudos conduzidos pela IARC, foi observado o aumento de chances para o câncer cervical com o aumento do número de gestações. Mulheres com sete gestações ou mais apresentaram chance, aproximadamente, quatro vezes maior (IC 95%: 1,9-7,9) de apresentar câncer cervical quando comparadas às mulheres nulíparas. Esta relação pode estar associada à manutenção prolongada da zona de transformação na ectocérvice ou a alterações hormonais como níveis aumentados de estrogênio e progesterona (HILDESHEIM et al., 2001; MUÑOZ et al., 2002; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

O tabagismo parece também aumentar o risco de câncer cervical em mulheres positivas para o HPV. Isso porque carcinógenos presentes no tabaco podem ser encontrados no muco cervical e o tabaco pode danificar diretamente o DNA ou comprometer a resposta imunológica local, facilitando a persistência do HPV (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

A associação entre uma história de DST e o câncer de colo de útero tem sido explorada mais frequentemente para a *Chlamydia trachomatis* (VRTACŇIK-BOKAL, 2003; GOLIJOW et al., 2005; SAMOFF et al., 2005; FINAN et al., 2006).

A infecção por *C. trachomatis* tem sido relatada como um dos principais co-fatores que potencializam a transformação maligna causada pelo HPV (TAMIM et al., 2002; SAMOFF et al., 2005; DE PAULA et al., 2007).

1.4 *Chlamydia trachomatis*

A *C. trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória, pertencente à família *Chlamydiaceae*. Diferem-se dos vírus pelo fato de possuírem DNA e RNA. São bacilos gram-negativos pequenos e não possuem a camada de peptidoglicano na parede celular; possuem sensibilidade a determinados antibióticos e são desprovidos de motilidade. Essa bactéria possui 7 a 10 cópias de plasmídeos por célula bacteriana e no gene codificador de maior proteína externa (MOMP), é detectada apenas uma cópia (PAAVONEN; EGGERT-KRUSE, 1999; MIRANDA et al., 2003; MURRAY et al., 2004; BARROS et al., 2007; AL-DARAJI; SMITH, 2009).

Apesar de serem, geralmente, assintomáticas, as infecções do trato geniturinário por *C. trachomatis* são as principais causas de morbidade em mulheres sexualmente ativas e podem causar seqüelas graves como doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica e infertilidade tubária (GOLIJOW et al., 2005).

A *C. trachomatis* possui 19 sorotipos humanos diferentes, já identificados. Os sorotipos de A-C têm sido associados com o tracoma, de D-K, com infecções urogenitais e L1, L2 e L3 são apontados como responsáveis pelo linfogranuloma venéreo (YUAN et al., 1989; BANDEA et al., 2001; NGANDJIO, et al., 2004; MIN-CHIH et al., 2006).

São estimados que 19 milhões de novas infecções por DST ocorram a cada ano nos Estados Unidos e, quase metade deste número, em mulheres jovens com idade entre 15 a 24 anos. Deste total, mais de 1,5 milhão são infecções causadas pela *C. trachomatis* (WEINSTOCK et al., 2004; CDC, 2010).

A infecção por *C. trachomatis* é a DST mais comumente reportada nos Estados Unidos. Em 2008, foram relatados 1.210.523 diagnósticos de clamídia, observando-se um aumento de 9,2% em relação ao ano de 2007 (1.100.000). Estima-se que, aproximadamente, 2.8 milhões de novos casos ocorram por ano, sendo que a maioria destes não é diagnosticado ou reportado (WEINSTOCK et al., 2004; CDC, 2010).

Guaschino e Seta (2000) relatam uma estimativa de 10 milhões de novos casos por ano na Europa.

Golijow et al. (2005) descreveram uma prevalência de 11,4% de *C. trachomatis* em mulheres argentinas, utilizando-se a técnica da PCR.

A estimativa do Ministério da Saúde para infecções por *C. trachomatis*, no Brasil é de 1.967.200 por ano. No entanto, o diagnóstico desta infecção assim como o relato desta ocorrência são escassos. Não existem muitos dados ou informações que demonstrem a situação real da infecção por *C. trachomatis*. Esta situação é relacionada, muitas vezes, à própria assintomatologia clínica nas mulheres e à dificuldade de acesso aos exames laboratoriais que, geralmente, são considerados inviáveis por seu alto custo e difícil realização (PASSOS et al., 2010).

Um estudo, a nível nacional, realizado pelo Ministério da Saúde (2008) relatou uma prevalência de infecções por *C. trachomatis* de 7,3% (150/2058), utilizando-se a técnica de captura híbrida, em mulheres que procuraram atendimento em clínicas de DST. Esse mesmo estudo demonstrou a prevalência de infecções por *C. trachomatis* para 5 cidades brasileiras, a saber: Fortaleza-CE (2,2%), Goiânia-GO (5,8%), Manaus-AM (10%), Porto Alegre-RS (12,2%) e São Paulo-SP (5,5%).

Em estudo realizado com mulheres sexualmente ativas, em Manaus-AM, Alencar et al. (1993) relataram 27,1% dos exames positivos para *C. trachomatis* utilizando-se da técnica de imunofluorescência direta e anticorpos monoclonais em esfregaços endocervicais, e confirmaram a alta prevalência desta infecção em Manaus.

Santos et al. (2003) observaram uma positividade de 20,6% utilizando-se a técnica por PCR em esfregaços endocervicais de mulheres sexualmente ativas também na cidade de Manaus-AM.

Alfaia (2005), estimou uma prevalência de 11% em estudo com 100 gestantes, através da PCR em Manaus-AM.

Freitas (2007), em um estudo envolvendo 106 mulheres recrutadas em uma clínica de infertilidade de Manaus-AM, relatou a prevalência de *C. trachomatis* em 52,8% de suas amostras, utilizando-se a técnica por PCR.

1.4.1 Ciclo de Desenvolvimento da *C. trachomatis*

A *C. trachomatis* apresenta um ciclo de desenvolvimento bifásico e replicação dentro de vacúolos da célula hospedeira, originando inclusões citoplasmáticas características. Neste ciclo (FIGURA 3), ocorrem duas formas bem distintas: os corpos elementares (CE – forma infecciosa), que não podem se dividir e que servirão apenas para propagar a infecção de uma

célula a outra e os corpos reticulares (CR – forma não infecciosa e metabolicamente ativa da clamídia) (GIRALDO; SIMÕES, 2000; PASSOS et al., 2010).

Os CE entram no endossoma da célula hospedeira após penetrar, através de receptores, na superfície da célula epitelial, geralmente célula endocervical e/ou metaplásica susceptível à clamídia. Após 8h, os CE se transformam em CR, começando a replicação por divisão binária e o ciclo se completa dentro do endossoma. Os CR são maiores em tamanho e mais ricos em RNA. Em torno de 24-72 h o CR retorna à forma de CE, formando vacúolos que contém de 100 a 1000 CE. Quando todo o citoplasma da célula hospedeira é substituído por esses vacúolos, ocorre a lise e os CE são lançados para o meio extracelular, tornando possível a infecção de novas células, seguindo-se o início de um novo ciclo de infecção (SEADI et al., 2002; HAMDAD et al., 2004).

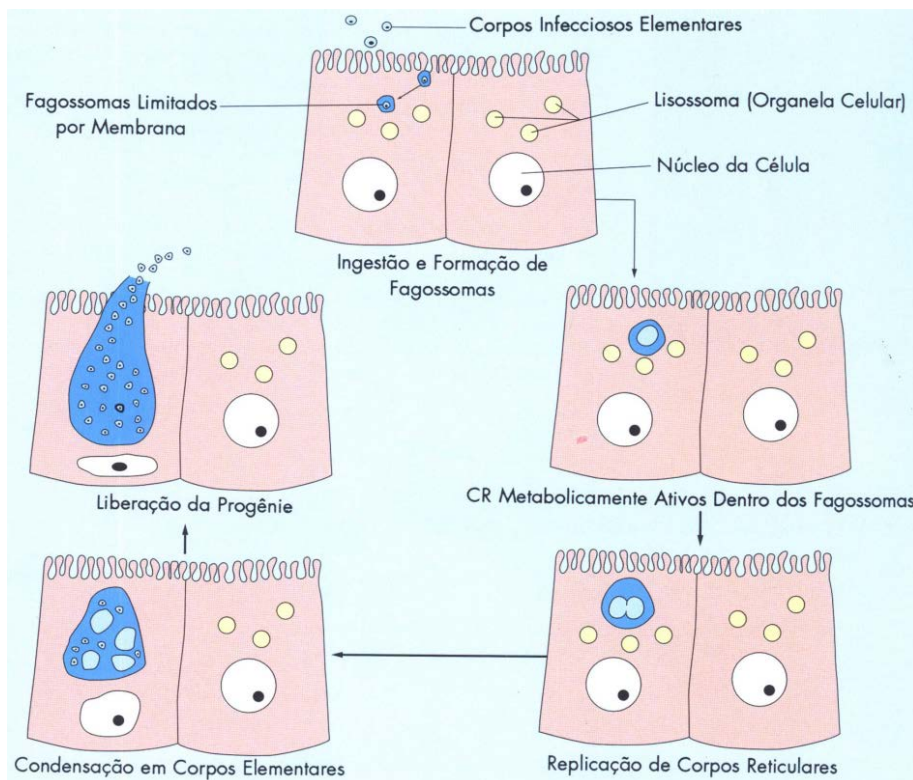


Figura 3: Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*.
Fonte: PASSOS et al., 2010.

A *C. trachomatis* tem atividade metabólica bastante restrita e não é capaz de produzir sua própria energia. É considerada parasita energético, pois utiliza o ATP produzido pela célula hospedeira (SEADI et al., 2002).

1.4.2 Diagnóstico da *C. trachomatis*

A sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico têm relação direta com a amostra coletada. Para o diagnóstico baseado em cultura de células e pesquisa direta da *Chlamydia* emprega-se, tradicionalmente, o *swab* endocervical ou uretral. Para os testes de amplificação podem ser usadas amostras de urina. Nos testes indiretos, é recomendada especial atenção para a possibilidade de reações cruzadas interespecies (SEADI et al., 2002; PASSOS et al., 2010).

A cultura de células em meio de cultivo McCoy era considerada o teste padrão ouro no diagnóstico de *C. trachomatis*. Neste teste, a presença de inclusões citoplasmáticas de CE e CR, após o tecido ter sido corado com anticorpo monoclonal fluorescente, indica positividade. Algumas restrições como o custo elevado, a demora no resultado (48-72 horas após a inoculação), o fato de detectar apenas bactérias vivas e os cuidados para manter os microorganismos viáveis tornaram este método desfavorável (BLACK, 1997; SEADI et al., 2002; HAMDAD et al., 2004; JACKSON, 2005).

Os dois antígenos melhor relacionados ao diagnóstico e patogênese da infecção por *C. trachomatis*, detectados por técnicas como imunofluorescência direta e ensaio imunoenzimático, são o antígeno lipopolissacarídico (LPS), mais encontrado no CR e o antígeno *major outer membrane protein* (MOMP). Os antígenos da MOMP, por serem espécies e subespécies-específicos, são utilizados para sorotipagem (SEADI et al., 2002).

A imunofluorescência direta consiste na identificação dos corpúsculos elementares com o uso de anticorpos monoclonais fluorescentes. A coleta de material é feita por *swab* endocervical. As estruturas antigênicas são visualizadas através do uso de anticorpos monoclonais contra o LPS, que favorece reações cruzadas com outras bactérias ou espécies de *Chlamydia* ou os testes direcionados para MOMP, que oferece menos resultados falsos positivos, por ser mais específico. Tanto a técnica quanto a interpretação dos resultados exigem treinamento técnico adequado, já que as ligações inespecíficas dos anticorpos levam a resultados falso-positivos (SEADI et al., 2002; HAMDAD et al., 2004).

O ensaio imunoenzimático (EIA) detecta o antígeno LPS ou MOMP através de anticorpos mono ou policlonais marcados com enzimas. Assim como na imunofluorescência, quando utilizado anticorpos anti-LPS, o teste fica sujeito a reações cruzadas com o LPS de outros microorganismos, como algumas bactérias gram-negativas (*Acinetobacter* sp., *Gardnerella*, *Neisserias*, salmonelas e algumas enterobactérias), revelando resultados falsamente positivos (CDC, 2002; SEADI et al., 2002; HAMDAD et al., 2004). Quanto à pesquisa de anticorpos, apesar da alta resposta imunológica às infecções por *Chlamydia*, a sorologia não é o melhor método para o seu diagnóstico. Não deve ser utilizado para *screening*, uma vez que, infecções prévias para *Chlamydia trachomatis* podem deixar níveis séricos de anticorpos elevados, tornando difícil a distinção temporal de um processo infeccioso. Técnicas como a imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático indireto e a microimunofluorescência indireta podem ser utilizadas. Esta última é considerada a mais sensível pelo fato de ter a vantagem de ser espécie e subespécie-específica, no entanto, é trabalhosa e de alto custo (BLACK, 1997; HAMDAD et al., 2004; JACKSON, 2005).

A pesquisa de ácidos nucleicos tem sido apontada como o exame mais promissor para o diagnóstico das infecções por *Chlamydia*. Pode ser feita através de sondas de DNA ou da amplificação de ácidos nucleicos, por PCR (HAMDAD et al., 2004; KELLOGG et al., 2004).

Sondas de DNA com seqüência complementar ao RNA ribossomal 16S do genoma da *Chlamydia* e marcadas com éster de acridina, ao hibridizar com o DNA da *C. trachomatis*, são absorvidas por magnetismo. A reação é quantificada com o uso de luminômetro. É um teste rápido quanto à obtenção de resultados (2-3h) e necessita de pequena amostra de material (SEADI et al., 2002; HAMDAD et al., 2004; JACKSON, 2005).

A PCR consiste na amplificação de seqüências gênicas específicas do microorganismo pesquisado, pela obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (*primers*) de uma seqüência de DNA-alvo. Os *primers* definem a especificidade da técnica. Esta técnica é capaz de detectar pequenas quantidades de ácidos nucléicos nas amostras utilizadas. Além do *swab* endocervical e uretral, possibilita a utilização de amostras de urina (KELLOGG et al., 2004; GAYDOS; QUINN, 2005).

No Brasil, são raros os locais que oferecem a pesquisa desse patógeno, quanto aos serviços públicos. Nos serviços privados, geralmente as pesquisas sobre clamídia se dão em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais relata a presença da infecção. Isto demonstra que a pesquisa de *C. trachomatis* ainda não faz parte da rotina da maioria dos profissionais de saúde que atendem DST (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

1.5 Co-infecção do HPV/ *C. trachomatis* e neoplasia cervical

Observações clínicas na década de 70 indicaram que infecções por *C. trachomatis* estavam associadas a atipias celulares e neoplasia cervical (SCHACHTER et al., 1975).

Silins et al. (2005) observaram que, um dos fatores de risco mais importantes para a persistência da infecção causada pelo HPV, foi uma prévia infecção por *C. trachomatis*.

De acordo com Fisher (2002), a infecção por *C. trachomatis* aumenta a expressão de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator do crescimento transformante alfa (TGF- α), o que pode potencializar os mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical.

Quanto à associação entre HPV e *C. trachomatis* na gênese do câncer cervical, a *C. trachomatis* parece causar uma modulação na resposta imune do tipo humoral, a qual parece impedir a resposta imune à infecção por HPV, fazendo com que haja o impedimento na resolução da infecção por este vírus (PINTO et al., 2002; SAMOFF et al., 2005; BARROS et al., 2007).

Segundo Scott et al. (2001), a diminuição na expressão de genes virais para reconhecimento imunológico (dificultando seu reconhecimento pelas células imunocompetentes), a diminuição na expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, a super expressão da proteína E7 (que inibe a apresentação de antígenos pelas células dendríticas), a menor susceptibilidade à lise mediada por linfócitos T citotóxicos das células infectadas e os efeitos de inibição do crescimento provocado pelas citocinas são mecanismos de evasão desenvolvidos pelo HPV e a modulação na resposta imune humoral causada pela infecção por *C. trachomatis* facilita ainda mais estes mecanismos.

Di Felice et al. (2005) levantam a hipótese de que as *heat shock proteins* 60 (HSP60), proteínas sintetizadas pela *C. trachomatis* tenham ação anti-apoptótica durante a infecção persistente e que, por meio delas, a atuação das oncoproteínas seria facilitada em células simultaneamente infectadas pelo HPV de alto risco.

Alguns estudos afirmam que a clamídia, a nível celular, pode aumentar a susceptibilidade de HPV ao nível de epitélio basal devido à alteração das características de células epiteliais que são formadas e, ainda, que está relacionada com a expressão do HPV-16 em NIC I, sugerindo que esta infecção modifica a atividade do HPV (FISCHER, 2002; MARKOWSKA et al., 2002; SMITH et al., 2004).

Golijow et al. (2005) descreveram a presença do DNA de *C. trachomatis* em 79 mulheres HPV-positivas que apresentaram citologia normal. A prevalência de *C. trachomatis* foi, ligeiramente, maior entre as mulheres HPV-positivas (12,5%) do que entre as mulheres HPV-negativas (10,9%).

Uma alta prevalência de *C. trachomatis* em amostras HPV-positivas, quando comparadas com amostras HPV-negativas, tem sido relatada por vários estudos (FINAN et al., 2002; SMITH et al., 2002b; GOLIJOW et al., 2005). Ainda assim, a relação entre as infecções por HPV e *C. trachomatis* ainda não é bem compreendida, o que não deixa claro o verdadeiro papel da *C. trachomatis* nesta associação (TAMIM et al., 2002).

Não é descartada a hipótese de que a infecção por *C. trachomatis* possa agir como um fator independente no desenvolvimento do carcinoma cervical (SMITH et al., 2002b).

São necessárias pesquisas adicionais para confirmar o papel desse agente infeccioso como co-fator da infecção por HPV no câncer cervical, mesmo sendo evidente que a infecção concomitante por outras DST poderia, sim, causar um processo inflamatório crônico, que resultaria em comprometimento da imunidade celular, facilitando, assim, a persistência da infecção por HPV (SMITH et al., 2002a; SMITH et al., 2002b; CASTLE; GIULIANO, 2003).

O câncer de colo do útero vem sendo apontado como o mais incidente na Região, diferente das outras regiões brasileiras. Estudos envolvendo a detecção do HPV e *C. trachomatis*, assim como, a verificação da co-infecção destes agentes, poderiam esclarecer fatores envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical, além de incentivar o diagnóstico precoce e, subsequente, tratamento das mulheres portadoras destas DST.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a co-infecção do Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais de dois grupos de mulheres: I. Citopatológico com alterações pré-malignas e malignas; II. Citopatológico sem alterações malignas (citopatológico normal e inflamatório).

2.2 Específicos

2.2.1 Detectar HPV e *C. trachomatis* nos dois grupos de estudo;

2.2.2 Identificar o tipo de HPV encontrado nos dois grupos de estudo;

2.2.3 Relacionar o tipo mais freqüente de HPV com o tipo de lesão citológica encontrada;

2.2.4 Relacionar a co-infecção HPV x *C. trachomatis* com o tipo de lesão encontrada;

2.2.5 Relacionar a co-infecção com os fatores sócio-econômico-ambientais e clínicos obtidos através do questionário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) conforme CAAE nº. 0008.0.115.000-09 (ANEXO 1).

3.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo do tipo transversal, que tem como objetivo investigar a co-infecção de Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas e em amostras cervicais de mulheres que apresentam resultados citopatológico normal e/ou inflamatório.

3.2 Universo de estudo

3.2.1 População de Referência

O estudo teve como alvo a população de mulheres residentes no estado do Amazonas (AM) há, pelo menos, dois anos com lesão pré-maligna ou maligna do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor e Adenocarcinoma) atendidas pelo Serviço de Ginecologia da FCECON-AM (GRUPO I), centro de referência na rede pública para lesões pré-malignas e malignas, e mulheres com citologia normal e/ou inflamatória atendidas no Serviço de

Ginecologia da Policlínica Castelo Branco (GRUPO II), ambas localizadas na cidade de Manaus (AM), nas zonas centro-oeste e centro-sul, respectivamente.

Essas mulheres foram convidadas a participar do estudo, recebendo explicações quanto aos objetivos, benefícios, riscos da pesquisa, confidencialidade dos registros e, as que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B) e responderam a um questionário padronizado (Apêndice C), através do qual foi possível traçar o perfil sócio-econômico da população de estudo. A partir deste questionário, foram avaliadas informações como idade, procedência, estado civil, nível de escolaridade, renda familiar, primeira relação sexual, primeira gravidez, número de abortos, número de gestações através de parto normal ou cesáreo, uso de anticoncepcionais, hábito de fumar, assim também como o número de parceiros sexuais.

As mulheres recrutadas para o estudo tiveram ainda que obedecer aos critérios de inclusão e/ou exclusão.

3.2.2 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão

3.2.2.1 Critérios de Inclusão para as mulheres atendidas na FCECON-AM

Mulheres residentes no Estado do Amazonas há, pelo menos, dois anos.

Mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão pré-malignas ou malignas do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor e Adenocarcinoma).

3.2.2.2 Critérios de Inclusão para as mulheres atendidas na Policlínica Castelo Branco

Mulheres residentes no Estado do Amazonas há, pelo menos, dois anos.

Mulheres com diagnóstico citológico sem alterações malignas, incluindo esfregaços citológicos normais e inflamatórios.

3.2.2.3 Critérios de Exclusão para as mulheres atendidas no FCECON-AM e na Policlínica Castelo Branco

Mulheres que já fizeram conização ou histerectomia total.

Mulheres indígenas.

Mulheres que estiverem fazendo uso de antibióticos.

Mulheres que já estiverem em tratamento de DST ou qualquer outra patologia do trato genital feminino nos últimos três meses.

3.2.3 Amostra

O material cervical referente ao GRUPO I, constituído por 153 mulheres, foi coletado no período de janeiro a julho de 2006 e fez parte da Dissertação de Mestrado da pesquisadora Júnia Raquel Dutra Ferreira intitulada “Detecção da infecção pelo HPV e do polimorfismo da proteína p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas”. O material cervical referente ao GRUPO II, composto de 167 mulheres, foi coletado no período de março a julho de 2009.

3.3 Fluxo de Procedimentos

3.3.1 GRUPO I

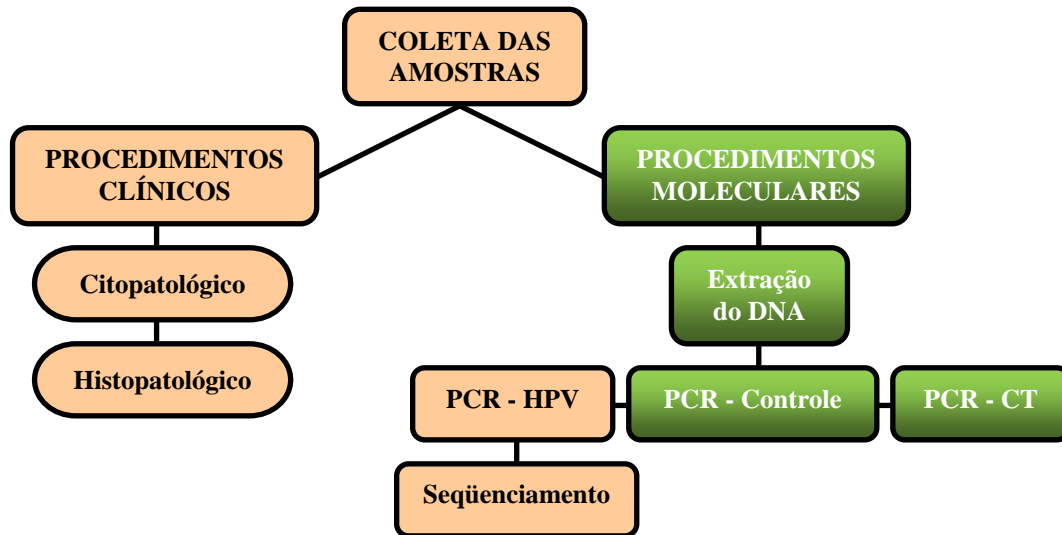


Figura 4: Fluxo de Procedimentos para o GRUPO I. Laranja: realizados neste estudo.

3.3.2 GRUPO II

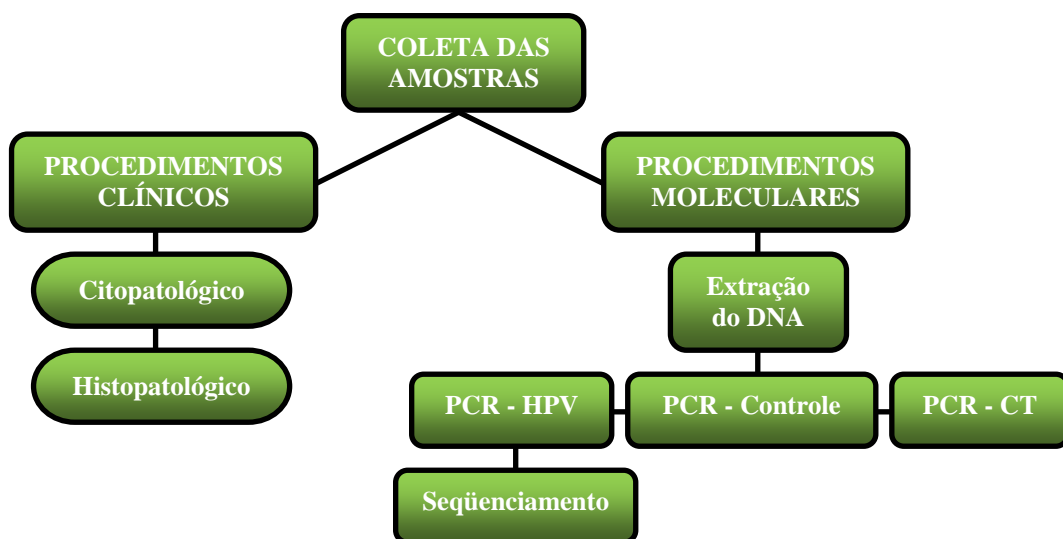


Figura 5: Fluxo de Procedimentos realizados para o GRUPO II, neste estudo.

3.4 Detalhamento dos Procedimentos

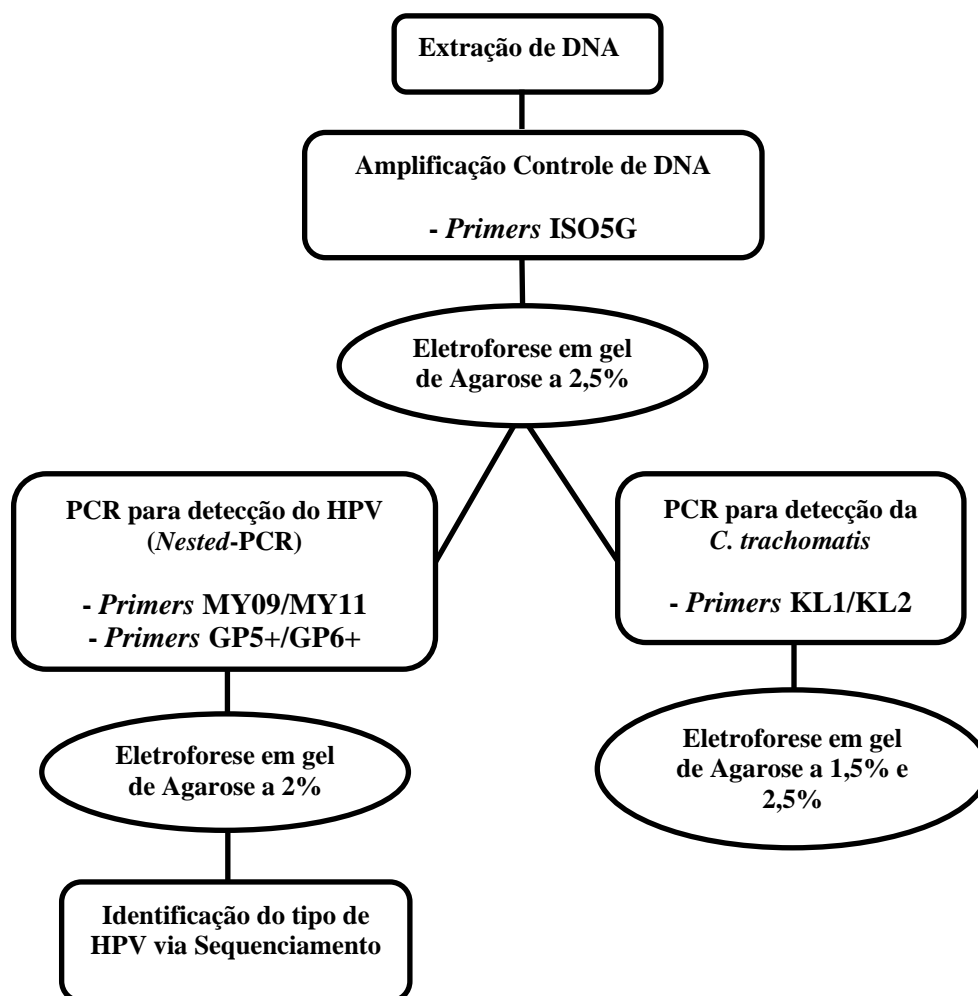


Figura 6: Fluxograma mostrando as etapas realizadas no laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM.

3.4.1 Coleta

As amostras foram coletadas da endocérvice das mulheres participantes do estudo com o auxílio de escovas endocervicais descartáveis (*cyto-brush*). Antes de serem transferidas para as lâminas e encaminhadas ao exame citopatológico, para que não houvesse algum perigo de contaminação, essas amostras foram transferidas para um microtubo descartável de 1,5 mL contendo 400 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). A partir

desse momento, as amostras foram mantidas em banho de gelo e encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sendo armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.4.2 Diagnóstico Molecular do HPV e *C. trachomatis*

3.4.2.1 Extração do DNA do HPV e *C. trachomatis*

As amostras mantidas a -20°C foram descongeladas e deixadas à temperatura ambiente para a execução da extração do DNA.

Aos 400 µL de amostra foram adicionados 400 µL de solução TPK. A solução de TPK consiste em uma mistura de 900 µL de TE , 100 µL de Tween 20 a 20% e 20 µL de proteinase K 10 mg/mL.

Essa mistura foi levada a banho-maria numa temperatura de 55°C por 1 hora e depois fervida durante 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas a -20°C até sua utilização (BAUER; MANOS, 1998).

As amostras contendo sangue foram submetidas à extração pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) (ANEXO 2).

3.4.2.2 Amplificação controle do DNA Humano

Para confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado, que servirá de controle da viabilidade do DNA extraído nas amostras para as reações de PCR, foi utilizado um par de *primers* (ISO5G) que amplificam uma região microsatélite (GATA)₁₃

do cromossoma 15 humano. A amplificação com ISO5G evidencia uma banda corespondente a 270 pares de base (pb) (PONTES et al., 2003).

O sistema de reação utilizado para um volume final de 20 μL foi composto de: 2,2 μL de água Milli-Q; 2,5 μL de Tampão da Enzima 10X (500 mM KCl e 100 mM Tris-HCl pH 8,5); 2,5 μL de MgCl_2 50 mM; 2,5 μL de dNTP 10 mM; 5,0 μL do *primer* ISO5G 5 pmol; 0,3 μL da Enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/ μL e 5,0 μL da solução contendo a amostra de DNA.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Condições da amplificação controle de DNA

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação	95°C	2 min	} 40 ciclos
Desnaturação	94°C	40 seg	
Anelamento	60°C	1 min	
Extensão	70°C	1 min e 30 seg	
Extensão Final	60°C	5 min	
<i>Manutenção/Hold</i>	4°C	Indefinido	

- Eletroforese em gel de agarose 2,5%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com 2 μL de brometo de etídeo [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas alíquotas com volume final de 10 μL composto de: 5 μL do produto da PCR; 3 μL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%) e 2 μL de Água Milli-Q. Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*.

Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultra Violeta em transiluminador UVPTM e fotografados em sistema digital.

3.4.2.3 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico de HPV

❖ *Primers* MY09/MY11

Para o diagnóstico do HPV, a reação de PCR utilizada é denominada *Nested-PCR* e consiste em duas etapas de amplificação consecutivas. A primeira etapa é realizada com 40 ciclos e utiliza o par de *primers* MY09 e MY11 para amplificar uma região que evidencia uma banda correspondente a 450pb (BAUER; MANOS, 1998) (TABELA 3).

O sistema de reação utilizado para um volume final de 25 μ L foi composto de: 13,6 μ L de água Milli-Q; 2,5 μ L de Tampão da Enzima 10X; 0,8 μ L de $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 μ L de dNTP 10 mM; 2,5 μ L do *primer forward* MY09 5 pmol; 2,5 μ L do *primer reverse* MY11 5 pmol; 0,1 μ L de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/ μ L e 2,5 μ L da solução contendo a amostra de DNA.

Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (água Milli-Q) e um controle positivo com uma amostra conhecida positiva para HPV (seqüenciada) do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

As reações de PCR para detecção com MY09/MY11 foram realizadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Condições da amplificação para diagnóstico do HPV

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação	95°C	1 min	} 40 ciclos
Desnaturação	95°C	1 min	
Anelamento	55°C	1 min	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão Final	72°C	5 min	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Indefinido	

- Eletroforese em gel de agarose 1,5%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com 2 μL de brometo de etídeo [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas alíquotas com volume final de 10 μL composto de: 5 μL do produto da PCR; 3 μL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%) e 2 μL de Água Milli-Q. Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*.

Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultra Violeta em transiluminador UVP™ e fotografados em sistema digital.

Os produtos amplificados foram armazenados a - 20°C.

❖ *Primers GP5+/GP6+*

Quando não foi possível observar o produto da primeira reação no gel de agarose, este foi submetido a uma segunda etapa de amplificação, com um par de *primers* localizados internamente à seqüência de nucleotídeos da primeira amplificação. Os *primers* GP5+ e GP6+ (BAUER; MANOS, 1998) têm como alvo a região conservada L1 do HPV, que é mais interna e evidencia uma banda que corresponde a 150 pb (TABELA 3).

Os produtos da PCR obtidos com os oligonucleotídeos MY09 e MY11 foram utilizados como amostra, sendo manipulados em outro ambiente laboratorial.

O sistema de reação utilizado para um volume final de 25 μL foi composto de: 15,1 μL de água MilliQ; 2,5 μL do Tampão da Enzima 10X; 0,8 μL de MgCl_2 50 mM; 0,5 μL de dNTP 10 mM; 2,5 μL do *primer forward* GP5+ 5 pmol; 2,5 μL do *primer reverse* GP6+ 5

pmol; 0,1 µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/µL; 1 µL de DNA do produto de PCR da reação com MY09/MY11.

Tabela 3: Seqüências dos primers utilizados para o diagnóstico de HPV e tamanhos dos produtos obtidos.

PRIMERS	SEQÜÊNCIA (5'→3')	PRODUTO
MY09	CGTCCMAARGGAWACTGATC	450 pb
MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG	
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC	150pb
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	

Posições nucleotídicas variáveis M=A ou C; R=A ou G, W=A ou T, Y=C ou T.

Para controle da reação, foi utilizado um branco (água Milli-Q) e um controle positivo com uma amostra conhecidamente positiva para HPV (seqüenciada) do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

A PCR para detecção do DNA do HPV com GP5+/GP6+, utilizaram as mesmas condições descritas para a detecção com MY09/MY11 (TABELA 2).

- Eletroforese em gel de agarose 2,5%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com 2 µL de brometo de etídeo [1 µg/µL], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas alíquotas com volume final de 10 µL composto de: 5 µL do produto da *Nested-PCR*; 3 µL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%) e 2 µL de Água Milli-Q. Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*.

Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultra Violeta em transiluminador UVP™ e fotografados em sistema digital.

Os produtos amplificados foram armazenados a - 20°C.

3.4.2.4 Purificação do Produto Amplificado

Todas as amostras amplificadas foram purificadas com o sistema que utiliza as enzimas *Exo-Sap* (Exonuclease – *Exo* e Fosfatase Alcalina de Camarão - *Sap*) e que consiste na eliminação de substâncias não incorporadas durante a reação de amplificação tais como: sais, *primers* e dNTPs.

O sistema de purificação para um volume final de 16,5 µL foi composto de: 15 µL de produto de PCR (MY09/MY11 ou GP5+/GP6+); 0,5 µL de Água Milli-Q; 0,4 µL da Enzima *Exo* e 0,6 µL da Enzima *Sap*.

As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 37°C e 20 minutos a 65°C, temperaturas ideais para a ação dessas enzimas.

3.4.2.5 Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada em uma placa específica para eletroinjeção em seqüenciador automático (contendo 96 poços).

O sistema da reação de seqüenciamento para um volume final de 20 µL foi composto de: 2 µL de Big Dye; 3 µL de Tampão; 4 µL *Primer* (podendo ser MY09 ou MY11 5 pmol ou GP5+ ou GP6+ 5 pmol); 6 µL de Água Milli-Q; 5 µL do produto da PCR purificado.

As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com as condições mostradas na Tabela 4 em termociclador *Applied Biosystems*.

Tabela 4: Condições para a Reação de Seqüenciamento

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação	96°C	1 min	} 25 ciclos
Desnaturação	96°C	15 seg	
Anelamento	50°C	15 seg	
Extensão	60°C	4 min	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Indefinido	

3.4.2.6 Precipitação do produto da reação de seqüenciamento

A precipitação do DNA foi feita utilizando-se do protocolo com Isopropanol/Etanol (ANEXO 3).

A ressuspensão das amostras foi feita utilizando-se Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems* P/N 4311320) (ANEXO 4).

Em seguida, as amostras foram seqüenciadas em seqüenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*) conforme metodologia padrão do fabricante.

3.4.2.7 Análise das seqüências

As seqüências foram conferidas utilizando-se o programa BioEdit Version 7.0.0 (Hall, 1999).

Os dados brutos foram enviados, via internet, para análise utilizando-se do programa PHRED, através do site: <www.bioinformatica.ufam.edu.br> (Universidade Federal do Amazonas)

Para confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada uma comparação das amostras seqüenciadas com as seqüências depositadas no Banco de Dados Mundial de

Nucleotídeos – GenBank, utilizando-se o programa BLAST/BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) através do site: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Foram consideradas válidas as homologias das seqüências com *e-value* menor que e^{-10} .

3.4.2.8 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico da *C. trachomatis*

Para o diagnóstico de *C. trachomatis*, a reação de PCR foi realizada com 40 ciclos utilizando-se o par de *primers* KL1 e KL2 (MAHONY et al., 1993). Estes *primers* amplificam um fragmento de 241 pb (TABELA 5) do DNA plasmidial da *C. trachomatis* tendo sido descritos por Mahony et al. (1993) e Schachter (1999).

Tabela 5: Seqüências dos *primers* utilizados para o diagnóstico de *C. trachomatis* e tamanho do produto obtido.

<i>PRIMERS</i>	SEQÜÊNCIA (5'→3')	PRODUTO
KL1	TCCggAgCgAgTTACgAAgA	241 pb
KL2	AATCAATgCCCgggATTggT	

O sistema de reação utilizado para um volume final de 25 µL foi composto de: 13,4 µL de água Milli-Q; 2,5 µL de Tampão da Enzima 10X; 1 µL de MgSO⁴ 50 mM; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 2,5 µL do *primer forward* KL1 5 pmol; 2,5 µL do *primer reverse* KL2 5 pmol; 0,1 µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* 5U/µL *Taq* polimerase 5U/µL e 2,5 µL da solução contendo a amostra de DNA.

Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (água Milli-Q) e um controle positivo com uma amostra conhecida positiva para *C. trachomatis* do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

As reações de PCR para detecção com KL1/KL2 foram realizadas de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6: Condições de amplificação para diagnóstico da *C. trachomatis*

Etapas	Temperatura	Tempo	
Desnaturação	94°C	30 seg	} 40 ciclos
Desnaturação	94°C	30 seg	
Anelamento	64°C	30 seg	
Extensão	68°C	2 min	
Extensão Final	68°C	5 min	
Manutenção/Hold	4°C	Indefinido	

- Eletroforese em gel de agarose 2%

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2% (p/v) em solução, corado com 2 µL de brometo de etídeo [1 µg/µL], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas alíquotas com volume final de 15 µL composto de: 10 µL do produto da PCR e 5 µL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%). Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*.

Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultra Violeta em transiluminador UVP™ e fotografados em sistema digital.

Os produtos amplificados foram armazenados a - 20°C.

3.5 Análise Estatística dos resultados

A análise da significância de diferença de proporções e posterior avaliação de existência ou não de associação entre variáveis foi realizada utilizando-se o Teste Qui-

Quadrado de *Pearson* (χ^2) e/ou o Teste Exato de Fisher, para os casos em que a frequência esperada fosse inferior a cinco ($p < 0,05$).

A análise das variáveis quantitativas foi realizada através da comparação das médias, quando constatado normalidades dos dados, utilizando-se o Teste t-student. Caso contrário, como alternativa não-paramétrica para o Teste t-student, utilizou-se o Teste de Mann-Whitney.

O nível de significância utilizado nos testes foi de 5% com um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram feitas através dos softwares R 2.9.0 e MiniTab 15.

4. RESULTADOS

4.1 GRUPO I

4.1.1 Características do GRUPO I

O GRUPO I foi constituído de 152 mulheres que tiveram resultado histopatológico confirmatório para as lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, sendo que 1,97% (3/152) apresentaram adenocarcinoma, 13,82% (21/152) apresentaram carcinoma invasor, 75% (114) apresentaram HSIL e 9,21% (14) LSIL, conforme representado no Gráfico 1.

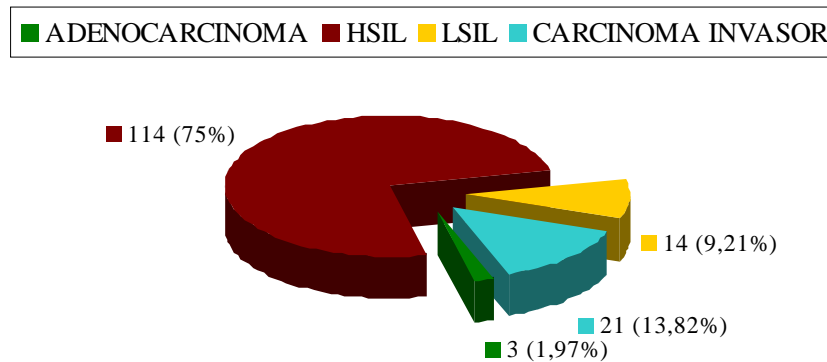


Gráfico 1: Distribuição do GRUPO I em relação ao tipo de lesão do colo do útero.

A média de idade encontrada neste grupo foi de 39 anos (DP \pm 11,1 anos) (TABELA 7). A maior parte das mulheres (83,55%) encontra-se na faixa etária de 21-50 anos. A idade mínima encontrada para este grupo foi de 17 anos e a idade máxima foi de 73 anos.

Quanto ao estado civil, 51,97% (79/152) das mulheres afirmaram ser casadas ou possuir uma união estável.

Em relação ao nível de escolaridade, 50% (76/152) possuem ensino fundamental incompleto e 63,82% (97/152) possuem renda de até 1 salário mínimo.

Tabela 7: Perfil sócio-econômico do GRUPO I

Variáveis	f	f (%)	Média ± DP	Amplitude
<i>Faixa Etária</i>				
16 - 20anos	1	0,66%	39 ± 11,1	17 - 73 anos
21 - 30 anos	38	25,00%		
31 - 40 anos	53	34,87%		
41 - 50 anos	36	23,68%		
51 - 65 anos	17	11,18%		
Acima de 65 anos	7	4,61%		
<i>Estado civil</i>				
Solteira	23	15,13%		
União Estável	32	21,05%		
Casada	79	51,97%		
Divorciada/Separada	14	9,21%		
Viúva	4	2,63%		
<i>Escolaridade</i>				
Ensino Fundamental Incompleto	76	50,00%		
Ensino Médio Incompleto	31	20,39%		
Ensino Médio Completo	37	24,34%		
Ensino Superior	7	4,61%		
NR	1	0,66%		
<i>Renda Familiar</i>				
Até 1 salário mínimo	97	63,82%		
De 2 a 3 salários mínimos	31	20,39%		
De 3 a 4 salários mínimos	13	8,55%		
De 5 a 6 salários mínimos	6	3,95%		
Acima de 6 salários mínimos	4	2,63%		
NR	1	0,66%		

f: Frequência; f (%): Frequência Relativa

NR: Não Responderam

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 8, verificou-se que a média de idade das mulheres na primeira relação sexual foi de 16 anos (DP ± 3,13 anos). A média de idade na primeira gestação foi de 18 anos (DP ± 5,28 anos). Quanto aos partos normais,

observou-se uma média de, aproximadamente 4 partos (DP \pm 2,82 partos), sendo que o número máximo de partos normais foi de 14.

Tabela 8: Perfil clínico do GRUPO I

Variáveis	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Idade da 1ª relação sexual	16,34	16	3,13	12	30
Idade da 1ª gestação	18,23	18	5,28	12	31
Nº total de abortos	0,74	0	1,22	0	8
Nº de partos normais	3,92	4	2,82	0	14
Nº de partos cesáreos	0,37	0	0,57	0	2

A Tabela 9 demonstra que, 53,29% (81/152) dessas mulheres fazem uso de algum tipo de anticoncepcional, 57,89% (88/152) não fumam, 35,53% (54/152) já tiveram cinco ou mais parceiros sexuais e 53,95% (82/152) delas têm resultado negativo para infecção do HIV, sendo que 42,76% (65/152) nunca fizeram este exame.

Tabela 9: Perfil clínico do GRUPO I (cont.)

Variáveis	f	f (%)
<i>Uso de anticoncepcional</i>		
Não	71	46,71%
Sim	81	53,29%
<i>Hábito de Fumar</i>		
Não	88	57,89%
Sim	22	14,47%
Fumou no passado	42	27,63%
<i>Número de parceiros sexuais</i>		
Um	33	21,71%
Dois	34	22,37%
Três	20	13,16%
Quatro	11	7,24%
Cinco ou mais	54	35,53%
<i>HIV</i>		
Negativo	82	53,95%
Positivo	4	2,63%
Nunca fez exame	65	42,76%
NR	1	0,66%

f: Frequência; f(%): Frequência Relativa
NR: Não responderam.

4.1.2 Procedimentos moleculares (GRUPO I)

Após amplificação utilizando-se os iniciadores ISO5G (PONTES et al., 2003), para confirmação da presença do DNA humano e verificação da integridade do DNA, as amostras foram consideradas adequadas para o diagnóstico molecular.

A infecção por HPV foi encontrada em 94,74% (144/152) mulheres. Utilizando-se dos iniciadores MY09/MY11 foi possível detectar a presença do DNA de HPV em 32% (49/152) das amostras. No entanto, 144 amostras foram positivas para HPV, quando utilizados os iniciadores GP5+/GP6+ (*Nested* – PCR).

Foram seqüenciados 84,03% (121/144) das amostras e, após comparação com as seqüências depositadas no GenBank, através do programa BLAST, foi possível identificar 10 tipos diferentes de HPV.

O tipo de HPV mais prevalente dentre as amostras seqüenciadas foi o HPV 16, encontrado em 82,65% (100/121) das amostras, seguido do HPV 18, encontrado em 4,13% (5/121) e HPV 33 encontrado em 4,13% (5/121) das amostras. No restante das amostras foram encontrados ainda o HPV 31 em 3,31% (4/121) das amostras e o HPV 45 em 1,65% (2/121) das amostras. As demais amostras (4,13%) foram positivas para os tipos 35, 53, 56, 58 e 66 (GRÁFICO 2).

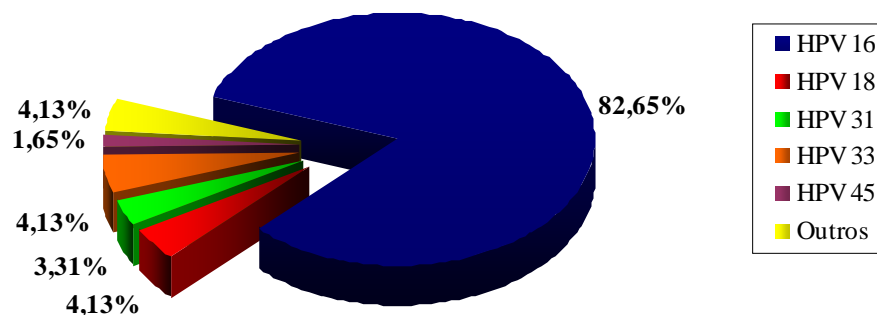


Gráfico 2: Tipos de HPV encontrados no GRUPO I

O HPV 16 foi encontrado nos quatro grupos de lesões representados neste estudo. Nas mulheres que apresentaram lesão do tipo HSIL, foi encontrado em 66,7% (76/114) e nas mulheres que apresentaram carcinoma cervical foi encontrado em 71,43% (15/21). Em mulheres que apresentaram LSIL e ADENOCARCINOMA, foi encontrado em 57,14% (8/14) e 33,33% (1/3), respectivamente, como demonstrado no Gráfico 3.

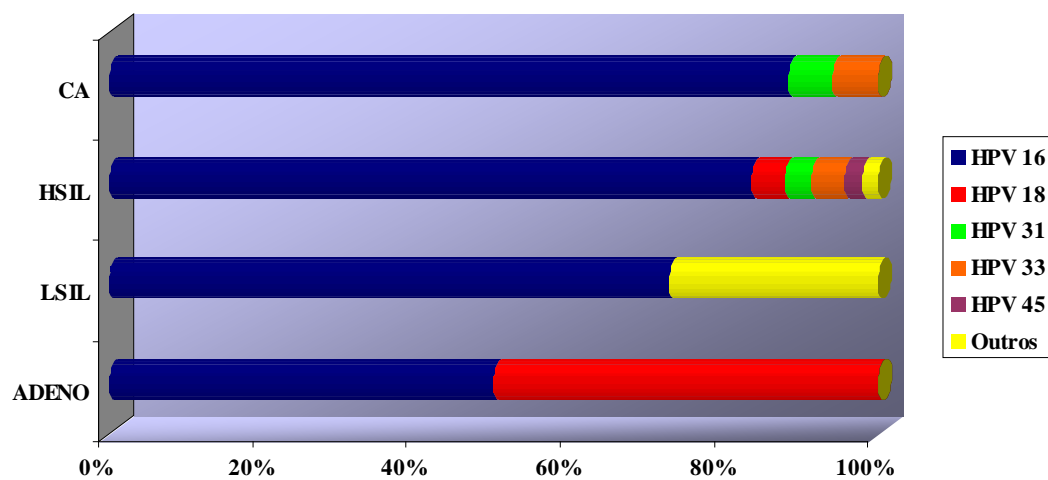


Gráfico 3: Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a lesão encontrada.

A amplificação do DNA de *C. trachomatis* foi realizada utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 (MAHONY et al., 1993) evidenciando um fragmento de 241 pb (FIGURA 7), correspondente à região amplificável do DNA plasmidial de *C. trachomatis*.

A infecção por *C. trachomatis* foi encontrada em 26,97% (41/152) das mulheres.

Foi encontrada co-infecção por HPV e *C. trachomatis* em 27,1% (39/144) das mulheres. Somente duas amostras de pacientes infectadas por HPV não foram positivas para *C. trachomatis*.

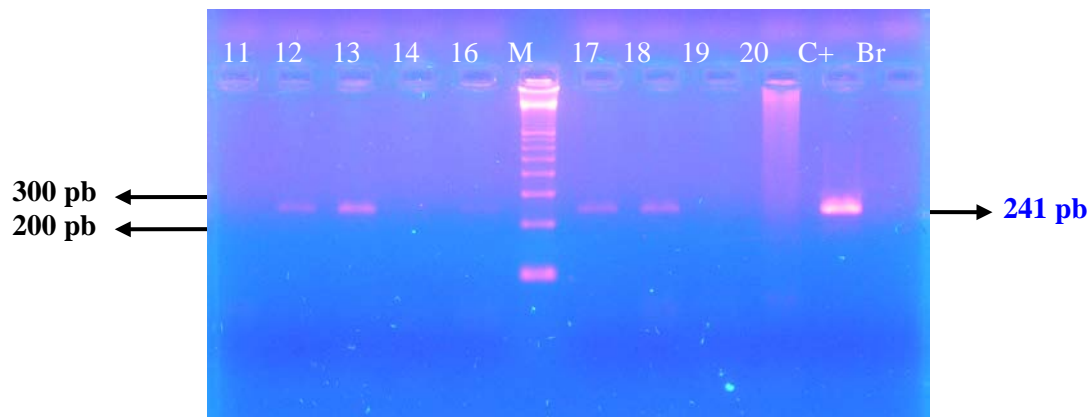


Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 241 pb, utilizando-se dos iniciadores KL1/KL2 (MAHONY et al., 1993). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 11-20; C+: Controle positivo; Br: Branco.

4.1.3 Co-infecção x Fatores sócio-econômicos-culturais e clínicos

Foi verificada a associação das variáveis sócio-econômicas-culturais e clínicas com a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* no GRUPO I.

Não foi encontrada associação entre os fatores sócio-econômicos-culturais (TABELA 10) e a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* neste grupo.

No entanto, foi possível observar que 8,55% (13/39) das mulheres co-infectadas se encontram na faixa etária de 31-40 anos, 18,42% (28/39) são casadas ou possuem união estável, 11,26% (17/39) não possuem o ensino fundamental incompleto e 16,56% (27/39) possuem renda familiar de até 1 salário mínimo.

Tabela 20: Distribuição das variáveis de acordo com a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* no GRUPO I.

Variáveis	Co-infecção por HPV e CT				Total	P-valor
	Negativo		Positivo			
	f	f (%)	F	f (%)	f	f (%)
Faixa Etária						
16 20 anos	1	0.66%	0	0.00%	1	0.66%
21 30 anos	27	17.76%	11	7.24%	38	25.00%
31 40 anos	40	26.32%	13	8.55%	53	34.87%
41 50 anos	26	17.11%	10	6.58%	36	23.68%
51 65 anos	13	8.55%	4	2.63%	17	11.18%
Acima de 65 anos	6	3.95%	1	0.66%	7	4.61%
Total	113	74.34%	39	25.66%	152	100.00%
Estado Civil						
Solteira	19	12.50%	4	2.63%	23	15.13%
União Estável	28	18.42%	4	2.63%	32	21.05%
Casada	55	36.18%	24	15.79%	79	51.97%
Divorciada/Separada	8	5.26%	6	3.95%	14	9.21%
Viúva	3	1.97%	1	0.66%	4	2.63%
Total	113	74.34%	39	25.66%	152	100.00%
Escolaridade*						
Ensino Fundamental Incompleto	59	39.07%	17	11.26%	76	50.33%
Ensino Médio Incompleto	24	15.89%	7	4.64%	31	20.53%
Ensino Médio Completo	23	15.23%	14	9.27%	37	24.50%
Ensino Superior	6	3.97%	1	0.66%	7	4.64%
Total	112	74.17%	39	25.83%	151	100.00%
Renda Familiar *						
Até 1 salário mínimo	72	47.68%	25	16.56%	97	64.24%
De 2 a 3 salários mínimos	23	15.23%	8	5.30%	31	20.53%
De 3 a 4 salários mínimos	11	7.28%	2	1.32%	13	8.61%
De 5 a 6 salários mínimos	1	0.66%	1	0.66%	2	1.32%
Acima de 6 salários mínimos	5	3.31%	3	1.99%	8	5.30%
Total	112	74.17%	39	25.83%	151	100.00%

P-valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fisher para tabelas r x c.

*As informações NR foram retiradas para a realização dos testes.

CT: *C. trachomatis*

A análise das variáveis clínicas foi realizada por meio de testes que verificaram a normalidade dos dados, no entanto nenhuma das variáveis apresentou essa normalidade. Neste caso, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação das medianas e posterior verificação de diferença significativa das variáveis quantitativas entre os grupos.

Nenhuma das variáveis clínicas quantitativas obteve *p*-valor significativo para a associação esperada, com exceção da variável Tipo de HPV.

Tabela 11: Distribuição das variáveis clínicas do GRUPO I de acordo com a co-infecção por HPV e *C. trachomatis*.

Variáveis	Co-infecção por HPV e CT				Total	P-valor
	Negativo		Positivo			
	f	f (%)	f	f (%)	f	f (%)
Uso de anticoncepcional*						
Não	53	34.87%	18	11.84%	71	46.71%
Sim	60	39.47%	21	13.82%	81	53.29%
Total	113	74.34%	39	25.66%	152	100.00%
Hábito de Fumar*						
Não	66	43.42%	22	14.47%	88	57.89%
Sim	17	11.18%	5	3.29%	22	14.47%
Fumou no passado	30	19.74%	12	7.89%	42	27.63%
Total	113	74.34%	39	25.66%	152	100.00%
Número de parceiros sexuais*						
Um	25	16.45%	8	5.26%	33	21.71%
Dois	28	18.42%	6	3.95%	34	22.37%
Três	11	7.24%	9	5.92%	20	13.16%
Quatro	10	6.58%	1	0.66%	11	7.24%
Cinco ou mais	39	25.66%	15	9.87%	54	35.53%
Total	113	74.34%	39	25.66%	152	100.00%
HIV*						
Negativo	62	41.06%	20	13.25%	82	54.30%
Positivo	49	32.45%	16	10.60%	65	43.05%
Nunca fez exame	1	0.66%	3	1.99%	4	2.65%
Total	112	74.17%	39	25.83%	151	100.00%
Tipo de lesão (Grupo câncer)						
ADENO	3	1.97%	0	0.00%	3	1.97%
LSIL	12	7.89%	2	1.32%	14	9.21%
HSIL	81	53.29%	33	21.71%	114	75.00%
CA	17	11.18%	4	2.63%	21	13.82%
Total	113	74.34%	39	25.66%	152	100.00%
Tipo de HPV						
HPV 16	75	52.08%	25	17.36%	100	69.44%
HPV 18	1	0.69%	4	2.78%	5	3.47%
HPV 31	4	2.78%	0	0.00%	4	2.78%
HPV 33	4	2.78%	1	0.69%	5	3.47%
HPV 35	1	0.69%	0	0.00%	1	0.69%
HPV 45	0	0.00%	2	1.39%	2	1.39%
HPV 53	1	0.69%	0	0.00%	1	0.69%
HPV 56	1	0.69%	0	0.00%	1	0.69%
HPV 58	0	0.00%	1	0.69%	1	0.69%
HPV 66	1	0.69%	0	0.00%	1	0.69%
Indeterminado	17	11.81%	6	4.17%	23	15.97%
Total	105	72.92%	39	27.08%	144	100.00%

P-valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fisher para tabelas r x c.

*As informações NR foram retiradas para a realização dos testes.

Apenas a variável Tipo de HPV obteve p -valor (0,0424) significativo, como observado na Tabela 11. O tipo HPV 16 esteve presente na maioria das mulheres do GRUPO I, tanto as que estavam co-infectadas quanto as que não estavam. A proporção de mulheres co-infectadas com HPV 16 corresponde a 64,10% (25/39) e nas mulheres sem a co-infecção, essa proporção foi de 71,43% (75/105).

A existência de associação entre a co-infecção por HPV e *C. trachomatis*, o tipo de HPV e o tipo de lesão encontrado nas mulheres do GRUPO I também foi verificada (TABELA 12).

Tabela 12: Relação co-infecção x HPV x lesão

Tipo de HPV	LSIL		Tipo de Lesão		CA		Total	P-valor
		%	HSIL	%		%		
HPV 16	1	2.56%	21	53.85%	3	7.69%	25	64.10%
HPV 18	0	0.00%	4	10.26%	0	0.00%	4	10.26%
HPV 33	0	0.00%	1	2.56%	0	0.00%	1	2.56%
HPV 45	0	0.00%	2	5.13%	0	0.00%	2	5.13%
HPV 58	0	0.00%	1	2.56%	0	0.00%	1	2.56%
NI	1	2.56%	4	10.26%	1	2.56%	6	15.38%
Total	2	5.13%	33	84.62%	4	10.26%	39	100.00%

* NI referem-se as mulheres cujo o tipo de HPV não foi identificado.

Mesmo não havendo p -valor significativo, foi possível observar que 64,10% (25/39) das mulheres co-infectadas no GRUPO I, estão infectadas pelo HPV 16 e que 53,85% (21/33) dos casos são em mulheres que apresentaram lesões do tipo HSIL.

4.2 GRUPO II

As 164 mulheres deste grupo tiveram resultado citopatológico inflamatório. Estas mulheres foram chamadas de saudáveis apenas por não apresentarem nenhum tipo de lesão.

4.2.1 Características do GRUPO II

As informações relativas ao perfil sócio-econômico do GRUPO II (TABELA 13) demonstram que a média de idade dessas mulheres foi de 36 anos (DP \pm 12,7 anos). Houve uma concentração de 55,49% (91/164) de mulheres na faixa etária de 21-40 anos, sendo que a idade mínima foi de 17 anos e a idade máxima de 75 anos.

Tabela 13: Perfil sócio-econômico do GRUPO II

Variáveis	f	f (%)	Média \pm DP	Amplitude
<i>Faixa Etária</i>				
16 - 20anos	15	9,15%	36 \pm 12,7	17 - 75 anos
21 - 30 anos	47	28,66%		
31 - 40 anos	44	26,83%		
41 - 50 anos	31	18,90%		
51 - 65 anos	23	14,02%		
Acima de 65 anos	4	2,44%		
<i>Estado civil</i>				
Solteira	53	32,32%		
União Estável	26	15,85%		
Casada	65	39,63%		
Divorciada/Separada	15	9,15%		
Viúva	5	3,05%		
<i>Escolaridade</i>				
Ensino Fundamental Incompleto	35	21,34%		
Ensino Médio Incompleto	22	13,41%		
Ensino Médio Completo	81	49,39%		
Ensino Superior	24	14,63%		
NR	2	1,22%		
<i>Renda Familiar</i>				
Até 1 salário mínimo	73	44,51%		
De 2 a 3 salários mínimos	52	31,71%		
De 3 a 4 salários mínimos	24	14,63%		
De 5 a 6 salários mínimos	9	5,49%		
Acima de 6 salários mínimos	5	3,05%		
NR	1	0,61%		

f: Frequência; f(%): Frequência Relativa

NR: Não Responderam

Em relação ao estado civil, 55,48% (91/164) das mulheres deste grupo são casadas ou possuem união estável.

Quanto ao nível de escolaridade, 49,39% (81/164) das mulheres completaram o ensino médio e 44,51% (73/164) recebem até 1 salário mínimo por mês.

Segundo os resultados demonstrados na Tabela 14, verificou-se que a média de idade das mulheres na primeira relação sexual foi de 17 anos (DP \pm 3,67 anos). A média de idade na primeira gestação foi de aproximadamente 21 anos (DP \pm 5,28 anos). Com relação ao número de partos normais, foi observada uma média de 1 parto normal (DP \pm 1,95 partos), sendo que o número máximo de partos normais encontrado, entre as mulheres deste grupo, foi 9.

Tabela 14: Perfil clínico do GRUPO II

Variáveis	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Idade da 1ª relação sexual	17.24	16.00	3.67	10.00	35.00
Idade da 1ª gestação	20.96	19.00	5.28	13.00	43.00
Nº total de abortos	0.60	0.00	0.90	0.00	4.00
Nº de partos normais	1.32	0.00	1.95	0.00	9.00
Nº de partos cesáreos	0.75	0.00	1.04	0.00	7.00

Como demonstrado na Tabela 15, 50% (82/164) dessas mulheres fazem uso de algum tipo de anticoncepcional, 62,80% (103/164) não fumam, 40,85% (67/164) já tiveram cinco ou mais parceiros sexuais e 39,63% (65/164) têm resultado negativo para infecção por HIV, sendo que 55,49% (91/164) nunca fizeram este exame. Vale ressaltar que 1,22% (2/164) relataram teste positivo para o HIV.

Tabela 15: Perfil clínico do GRUPO II (cont.)

Variáveis	f	f (%)
<i>Uso de anticoncepcional</i>		
Não	78	47,56%
Sim	82	50,00%
NR	4	2,44%
<i>Hábito de Fumar</i>		
Não	103	62,80%
Sim	25	15,24%
Fumou no passado	34	20,73%
NR	2	1,22%
<i>Número de parceiros sexuais</i>		
Um	27	16,46%
Dois	33	20,12%
Três	20	12,20%
Quatro	14	8,54%
Cinco ou mais	67	40,85%
NR	3	1,83%
<i>HIV</i>		
Negativo	65	39,63%
Positivo	2	1,22%
Nunca fez exame	91	55,49%
NR	6	3,66%

f: Frequência; **f (%)**: Frequência Relativa

NR: Não Responderam

4.2.2 Procedimentos moleculares (GRUPO II)

Para confirmar a presença do DNA humano e verificar sua integridade, foi realizada PCR utilizando-se os iniciadores ISO5G (PONTES et al., 2003). Todas as amostras, digeridas ou extraídas, foram positivas para o DNA humano e revelaram ótima qualidade, mostrando-se adequadas para a continuação do estudo (FIGURA 8).

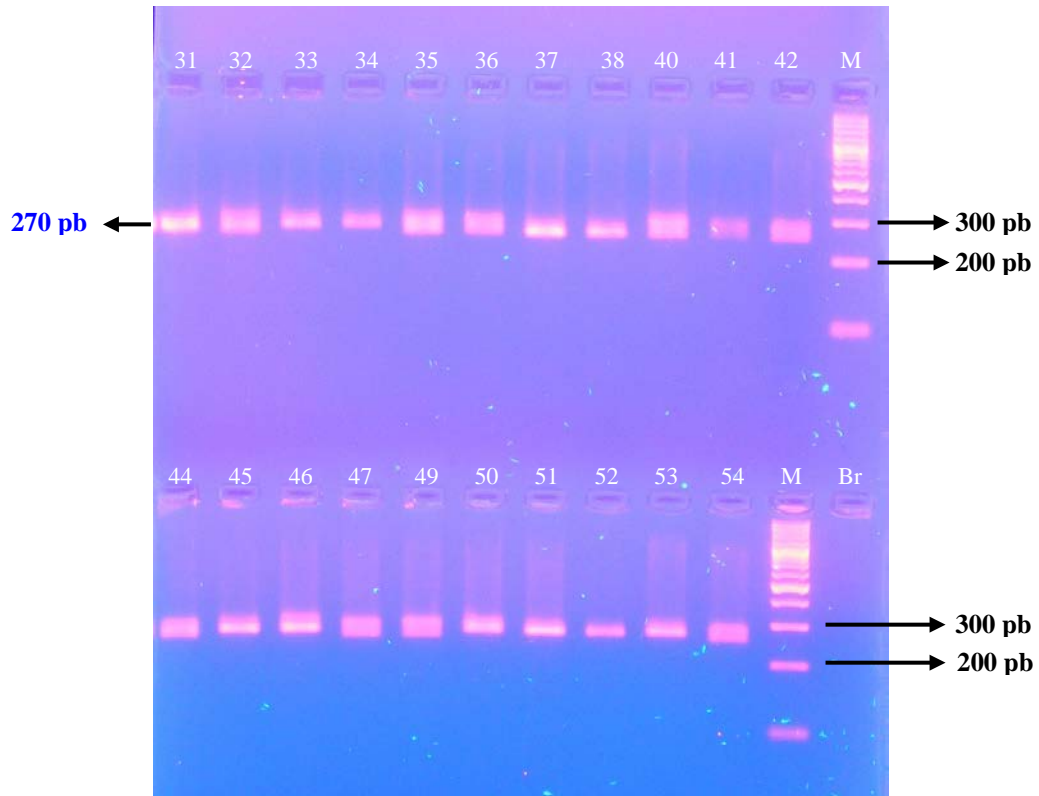


Figura 8: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 270pb correspondente a amplificação de uma região microssatélite (GATA)₁₃ do cromossoma 15 humano, utilizando-se dos iniciadores ISO5G (PONTES et a.l., 2003). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras de 31-42 e 44-54 correspondentes a material cervical; Br: Branco.

O diagnóstico molecular de HPV foi realizado utilizando-se a técnica *Nested-PCR*, conforme descrito para o GRUPO I.

Na primeira etapa, utilizando-se dos iniciadores MY09/MY11 que evidenciaram um fragmento de 450pb, foi possível detectar o DNA de HPV em 13,41% (22/164) das amostras, como pode ser observado na Figura 9.

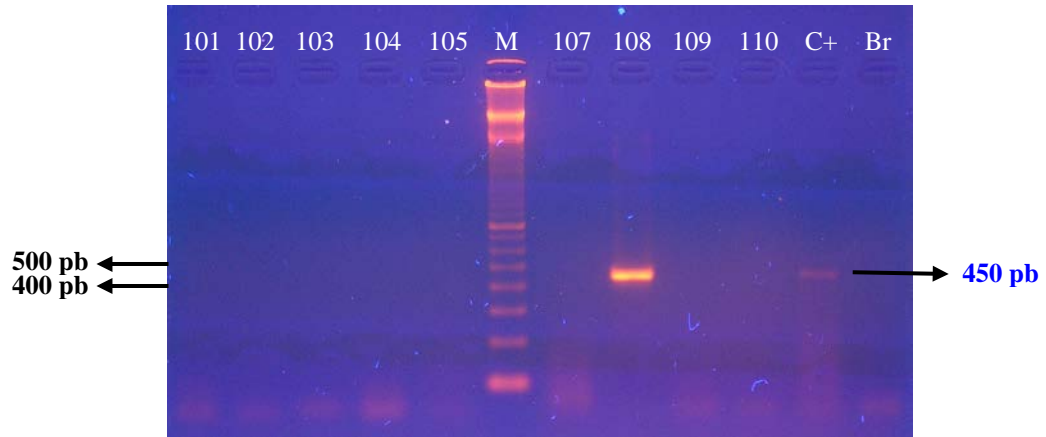


Figura 9: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 450 pb correspondente a amplificação da região L1 do capsídeo viral, utilizando-se dos iniciadores MY09/MY11 (BAUER; MANOS, 1998). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras de 101-110 correspondentes a material cervical; C+: Controle positivo; Br: Branco.

Na segunda etapa do diagnóstico, utilizando-se dos iniciadores GP5+/GP6+, foi possível detectar o DNA de HPV em 48,78% (80/164) das amostras. Esse resultado foi confirmado através da evidência de um fragmento de 150 pb após amplificação por PCR, (FIGURA 10).

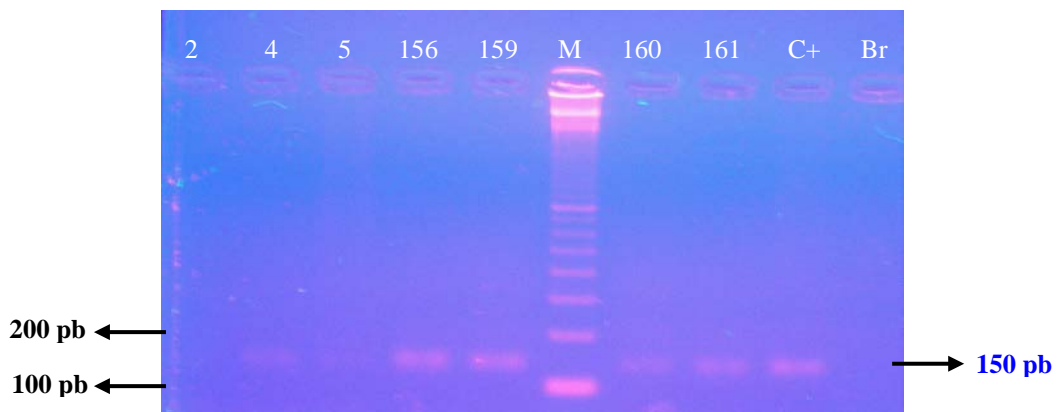


Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 150 pb correspondente à segunda etapa de amplificação da região L1 do capsídeo viral mais interna, utilizando-se dos iniciadores GP5+/GP6+ (BAUER; MANOS, 1998). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras de 2-5 e 156-161 correspondentes ao produto da amplificação com MY09/MY11; C+: Controle positivo; Br: Branco.

Foram seqüenciadas 97,5% (78/80) das amostras positivas para HPV. Dessas, somente 66 amostras apresentaram resultado satisfatório para a identificação do tipo de HPV encontrado. Foi possível identificar 7 tipos diferentes de HPV.

O tipo de HPV mais freqüente foi o HPV 16, encontrado em 90,91% (60/66) amostras. Destas, 56,1% (37/66) tiveram identificação com a variante amazônica do HPV 16. Nas demais amostras (9,09%) foram encontrados os tipos 6, 11, 31, 53, 56, 62 (GRÁFICO 4).

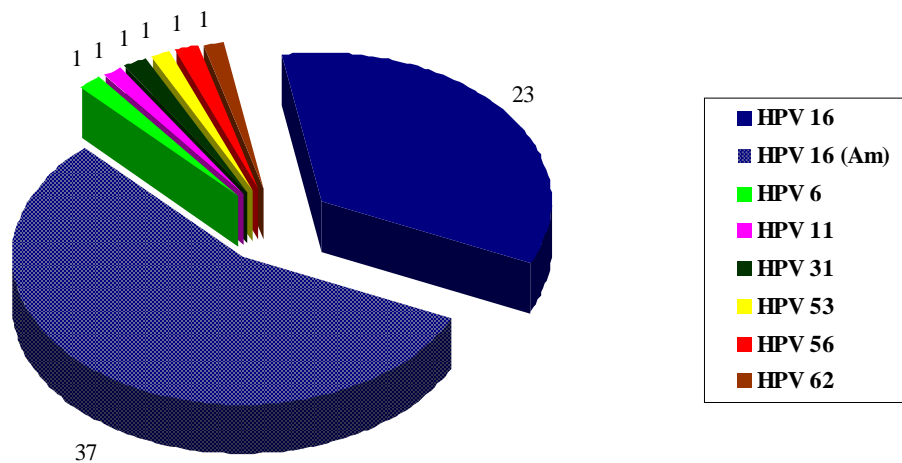


Gráfico 4: Tipos de HPV encontrados no GRUPO II

O diagnóstico molecular de *C. trachomatis* foi realizado utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 (MAHONY et al., 1993). O resultado para a presença do DNA desta bactéria foi confirmada pela evidência do fragmento de 241pb, em gel de agarose, após a PCR, como pode ser observado na Figura 11.

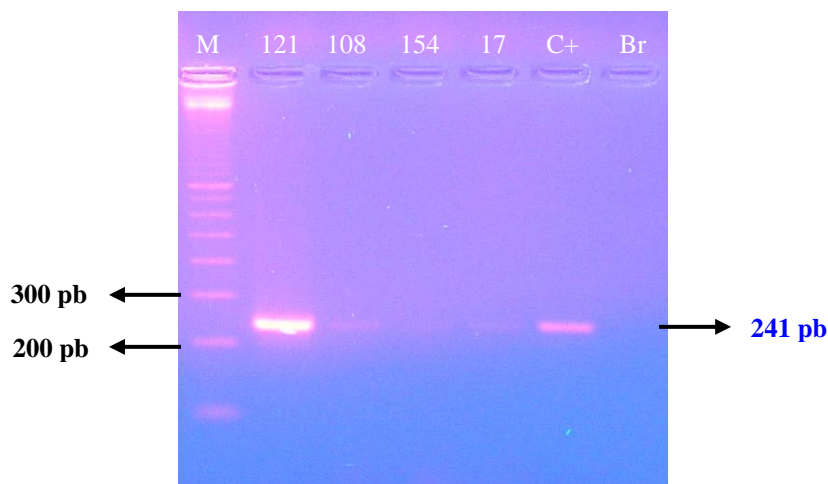


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 241 pb correspondente à amplificação, utilizando-se dos iniciadores KL1/KL2 (MAHONY et al., 1993). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 121, 108, 154 e 17; C+: Controle positivo; Br: Branco.

Foi possível detectar o DNA de *C. trachomatis* em 3,05% (5/164) mulheres do GRUPO II.

A co-infecção pelo HPV e *C. trachomatis* foi encontrada em 3,75% (3/80) das amostras.

Não foi possível avaliar a associação entre as variáveis dos fatores sócio-econômicos-culturais e a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* no GRUPO II. A proporção de mulheres co-infectadas neste grupo foi muito baixa, portanto, o teste não detectaria diferença alguma entre essas proporções.

4.3 Análise Estatística (GRUPO I e GRUPO II)

Os GRUPOS I e II foram submetidos a tratamento estatístico para verificar a associação entre os fatores sócio-econômicos-culturais e clínicos. Os resultados dos testes realizados podem ser encontrados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16: Comparação entre as variáveis dos GRUPOS I e II.

Variáveis	Análise Conjunta				Total		P-valor
	Saudáveis		Com lesão		f	f (%)	
Faixa Etária	f	f (%)	f	f (%)	f	f (%)	
16 - 20anos	10	3.16%	1	0.32%	11	3.48%	
21 - 30 anos	52	16.46%	38	12.03%	90	28.48%	
31 - 40 anos	44	13.92%	53	16.77%	97	30.70%	
41 - 50 anos	31	9.81%	36	11.39%	67	21.20%	0.0344
51 - 65 anos	23	7.28%	17	5.38%	40	12.66%	
Acima de 65 anos	4	1.27%	7	2.22%	11	3.48%	
Total	164	51.90%	152	48.10%	316	100.00%	
<hr/>							
Estado Civil							
Solteira	53	16.77%	23	7.28%	76	24.05%	
União Estável	26	8.23%	32	10.13%	58	18.35%	
Casada	65	20.57%	79	25.00%	144	45.57%	
Divorciada/Separada	15	4.75%	14	4.43%	29	9.18%	0.0073
Viúva	5	1.58%	4	1.27%	9	2.85%	
Total	164	51.90%	152	48.10%	316	100.00%	
<hr/>							
Escolaridade*							
Ensino Fundamental Incompleto	35	11.18%	76	24.28%	111	35.46%	
Ensino Médio Incompleto	22	7.03%	31	9.90%	53	16.93%	
Ensino Médio Completo	81	25.88%	37	11.82%	118	37.70%	3.883E-09
Ensino Superior	24	7.67%	7	2.24%	31	9.90%	
Total	162	51.76%	151	48.24%	313	100.00%	
<hr/>							
Renda Familiar *							
Até 1 salário mínimo	73	23.25%	97	30.89%	170	54.14%	
De 2 a 3 salários mínimos	52	16.56%	31	9.87%	83	26.43%	
De 3 a 4 salários mínimos	24	7.64%	13	4.14%	37	11.78%	
De 5 a 6 salários mínimos	9	2.87%	6	1.91%	15	4.78%	0.0142
Acima de 6 salários mínimos	5	1.59%	4	1.27%	9	2.87%	
Total	163	51.91%	151	48.09%	314	100.00%	

P-valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fisher para tabelas r x c.

*As informações NR foram retiradas para a realização do teste.

Observou-se que todos os p -valores obtidos foram significativos para o teste de associação entre os GRUPOS I e II.

No caso da faixa etária ($p=0,0344$), observou-se uma concentração de mulheres na faixa etária de 21 a 50 anos. No entanto, a concentração de mulheres com lesão na faixa etária de 31 a 50 anos, correspondendo a 28,16% (89/152), foi visivelmente maior do que as mulheres saudáveis, que corresponderam a 23,73% (75/164).

Em relação ao estado civil ($p=0,0073$), observou-se uma concentração maior de mulheres com lesão que afirmaram estar casadas ou em uma união estável. Quando comparado às mulheres saudáveis, essa concentração também é maior nesses dois níveis de estado civil. No grupo de mulheres saudáveis, a concentração de mulheres solteiras 16,77% (53/164) é a maior quando comparada às mulheres com lesão 7,28% (23/152).

Quanto ao nível de escolaridade o p -valor foi aproximadamente zero. Observou-se maior concentração de mulheres com lesão no ensino fundamental incompleto (24,28%) quando comparado às mulheres com saudáveis (11,18%). A maior concentração de mulheres saudáveis encontrou-se no ensino médio completo e superior (33,55%).

Em relação à renda familiar ($p=0,0142$), observou-se uma concentração maior de mulheres com lesão que possuem renda de até 1 salário mínimo (30,89%). Quanto aos outros níveis salariais, a concentração de mulheres saudáveis (28,66%) se destaca em relação ao grupo de mulheres com lesão (17,2%).

Para a comparação de medianas e posterior verificação de diferença significativa das variáveis clínicas entre os grupos, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados dos testes podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17: Comparação das variáveis clínicas entres os GRUPOS I e II.

Variáveis	Mediana	P-valor	Intervalo de Confiança
<i>Idade da 1ª relação sexual</i>			
Saudáveis	16,00	0,0065	(0,000 ; 1,000)
Com lesão	16,00		
<i>Idade da 1ª gestação</i>			
Saudáveis	19,00	0,0000	(0,999 ; 2,999)
Com lesão	18,00		
<i>Nº total de abortos</i>			
Saudáveis	0,00	0,5320	(-0,0001 ; 0,0000)
Com lesão	0,00		
<i>Nº de partos normais</i>			
Saudáveis	0,00	0,0000	(-2,9998 ; 0,0003)
Com lesão	4,00		
<i>Nº de partos cesáreos</i>			
Saudáveis	0,00	0,0011	(-0,0000 ; 0,0001)
Com lesão	0,00		

P-valor: Teste Mann-Whitney.

Quando analisada a variável idade da 1ª relação sexual ($p=0,0065$), observou-se que não houve diferença entre as medianas, no entanto, o valor de p indica a existência de diferença significativa. Para melhor visualização dessa diferença, foram construídos boxplot das variáveis (FIGURA 12).

Pode-se observar através da Figura 12 que, mesmo não havendo diferença entre as medianas dos grupos, a variabilidade no grupo das saudáveis foi maior do que no grupo de mulheres com lesão e a faixa de idade da 1ª relação sexual no grupo de mulheres com citopatológico inflamatório se concentra entre 15 e 19 anos, enquanto que no grupo de mulheres com lesão está entre 15 e 17 anos.



Figura 12: Boxplot da variável “Idade da 1ª relação sexual” entre os GRUPOS.

Em relação à variável idade da 1ª gestação, o p -valor obtido foi aproximadamente zero. Foram construídos boxplot das variáveis para a análise dessa diferença (Figura 13).

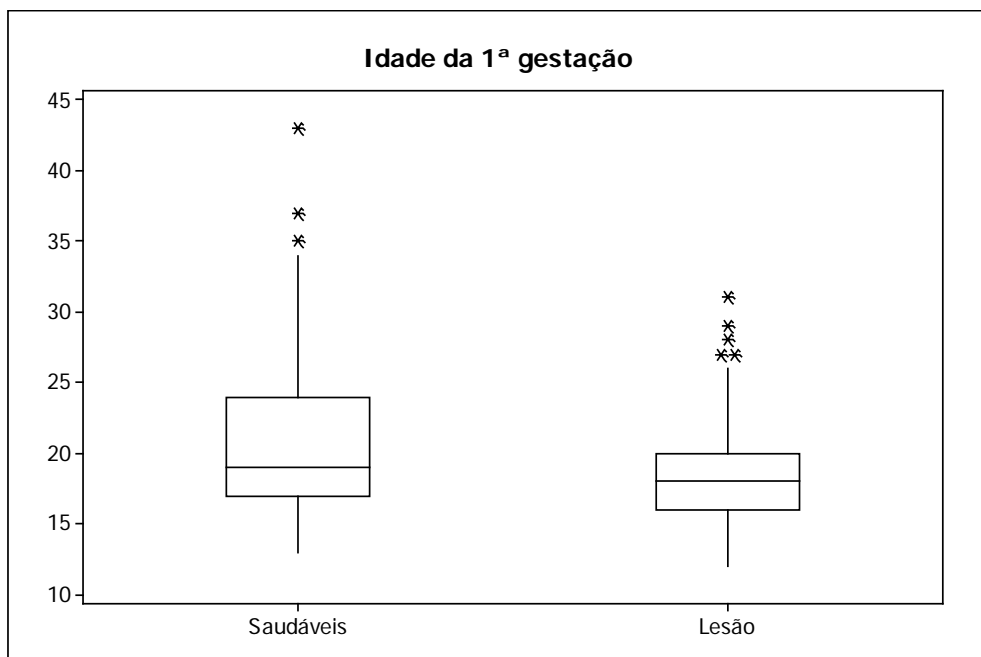


Figura 13: Boxplot da variável "Idade da 1ª gestação" entre os GRUPOS.

Foi possível observar que a variabilidade e o intervalo de valores no grupo de mulheres saudáveis foram maiores, sendo que a faixa de idade da 1ª gestação foi de 17 a 24 anos, com mediana de 19 anos. No grupo de mulheres com lesão, a faixa de idade da 1ª gestação foi de 16 a 20 anos, com mediana igual a 18 anos.

Quanto à análise do número de partos normais entre os grupos, o p -valor obtido para esse teste também foi aproximadamente zero, o que indica que existe diferença significativa entre o número de partos normais dos grupos. Foi construído boxplot para melhor análise dessa diferença (Figura 14).

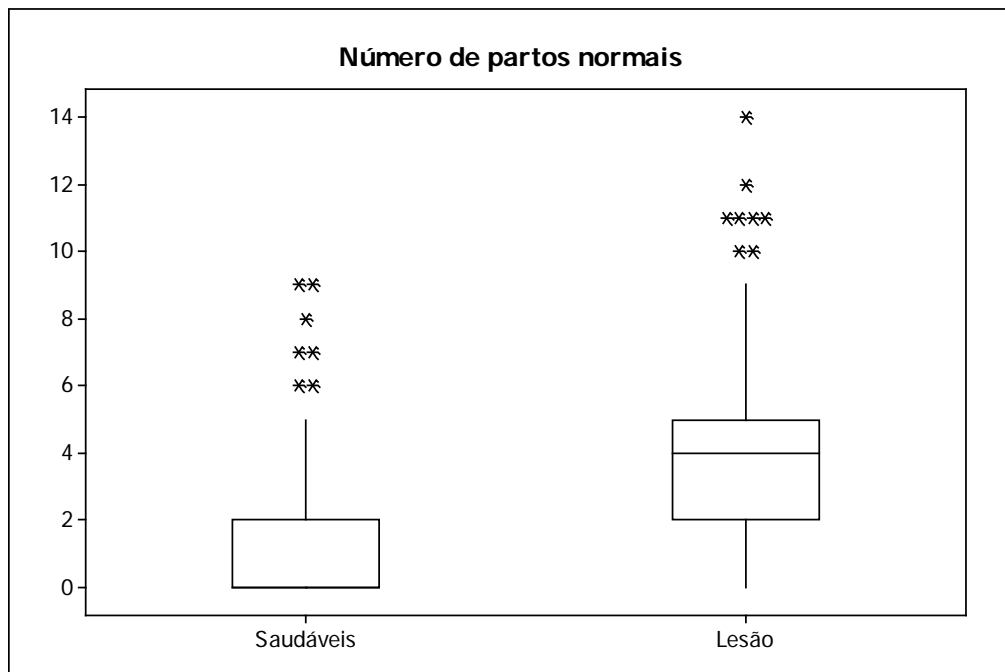


Figura 14: Boxplot da variável "Nº de partos normais" entre os GRUPOS.

Foi possível observar que, neste caso, a variabilidade e o intervalo de valores foram maiores no grupo de mulheres com lesão. A faixa observada foi de 2-5 partos normais, com

mediana igual a 4. Já no grupo de mulheres saudáveis essa faixa foi bem menor, a média foi de 0-2 partos normais com mediana igual a 0.

Em relação ao número de partos cesáreos ($p=0,0011$), foi possível observar que não houve diferença entre as medianas e as faixas médias de partos deste tipo entre os grupos, no entanto, o grupo de mulheres saudáveis apresenta um intervalo de valores bem maior que o grupo de mulheres com lesão, chegando a 7 partos cesáreos, como pode ser observado através da Figura 15.

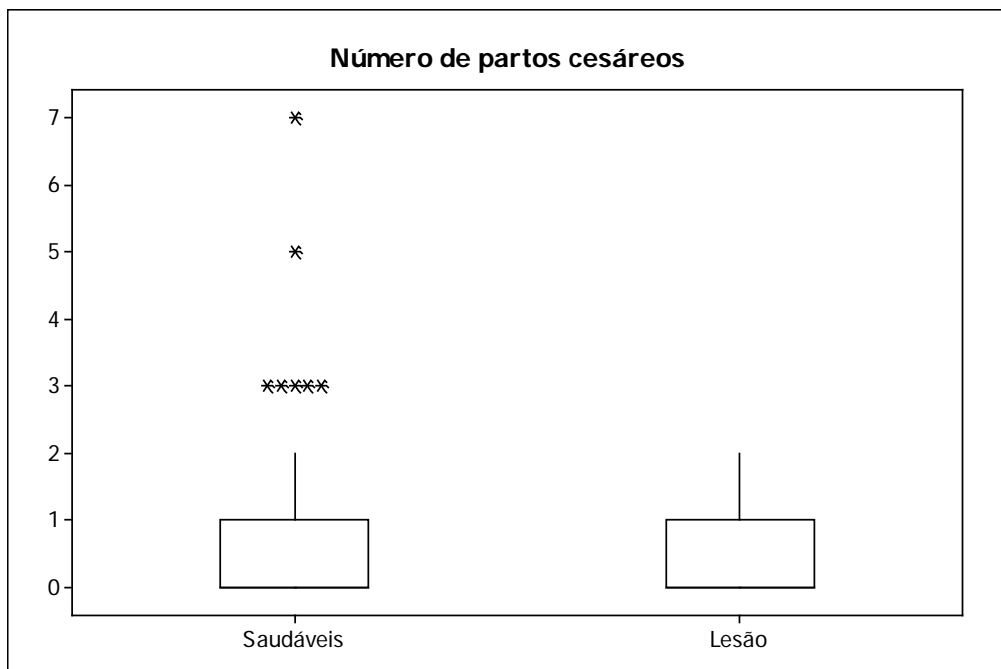


Figura 15: Boxplot da variável "Nº de partos cesáreos" entre os GRUPOS.

Quando analisadas as variáveis clínicas qualitativas observou-se que os p -valores obtidos para as variáveis “Uso de anticoncepcional”, “Hábito de fumar” e “Número de Parceiros sexuais” não foram significativos (TABELA 18).

Entretanto, com relação às variáveis HIV, HPV, *C. trachomatis* e co-infecção (HPV x *C. trachomatis*), foi observada significância estatística.

Tabela 18: Comparação das variáveis clínicas entres os GRUPOS I e II (cont.)

Variáveis	Análise Conjunta				Total	P-valor
	Saudáveis		Com lesão			
	f	f (%)	F	f (%)	f	f (%)
Uso de anticoncepcional*						
Não	78	25,00%	71	22,76%	149	47,76%
Sim	82	26,28%	81	25,96%	163	52,24%
Total	160	51,28%	152	48,72%	312	100,00%
Hábito de Fumar*						
Não	103	32,80%	88	28,03%	191	60,83%
Sim	25	7,96%	22	7,01%	47	14,97%
Fumou no passado	34	10,83%	42	13,38%	76	24,20%
Total	162	51,59%	152	48,41%	314	100,00%
Número de parceiros sexuais*						
Um	27	8,63%	33	10,54%	60	19,17%
Dois	33	10,54%	34	10,86%	67	21,41%
Três	20	6,39%	20	6,39%	40	12,78%
Quatro	14	4,47%	11	3,51%	25	7,99%
Cinco ou mais	67	21,41%	54	17,25%	121	38,66%
Total	161	51,44%	152	48,56%	313	100,00%
HIV*						
Negativo	65	21,04%	82	26,54%	147	47,57%
Positivo	2	0,65%	4	1,29%	6	1,94%
Nunca fez exame	91	29,45%	65	21,04%	156	50,49%
Total	158	51,13%	151	48,87%	309	100,00%
HPV						
Negativo	84	26,58%	8	2,53%	92	29,11%
Positivo	80	25,32%	144	45,57%	224	70,89%
Total	164	51,90%	152	48,10%	316	100,00%
C. trachomatis						
Negativo	159	50,32%	111	35,13%	270	85,44%
Positivo	5	1,58%	41	12,97%	46	14,56%
Total	164	51,90%	152	48,10%	316	100,00%
Co-Infecção HPV e C. trachomatis						
Negativo	161	50,95%	113	35,76%	274	86,71%
Positivo	3	0,95%	39	12,34%	42	13,29%
Total	164	51,90%	152	48,10%	316	100,00%

P-valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fisher para tabelas r x c.

* As informações NR foram retiradas para a realização do teste

Com relação ao exame de HIV ($p=0,0352$), foi observado uma positividade maior no grupo de mulheres com lesão do que no grupo de mulheres saudáveis.

Em relação à infecção por HPV, o p -valor foi aproximadamente zero, observando que a positividade nas mulheres com lesão (45,57%) foi bem maior que a positividade nas mulheres saudáveis (25,32%).

Quanto à infecção por *C. trachomatis*, o *p*-valor também foi aproximadamente zero e foi possível observar que essa infecção foi bem maior no grupo de mulheres com lesão (12,97%) do que no grupo de mulheres saudáveis.

Considerando a co-infecção por HPV e *C. trachomatis*, o *p*-valor também foi aproximadamente zero. Foi possível observar, ainda, que a co-infecção foi bem maior nas mulheres com lesão (12,34%) do que nas mulheres saudáveis (0,95%) e que, quase todas as mulheres co-infectadas apresentam lesões.

2. DISCUSSÃO

Este estudo analisou um total de 316 mulheres que foram divididas em dois grupos:

GRUPO I: constituído por 152 mulheres, caracterizadas por apresentarem lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, que foram atendidas pelo serviço de triagem da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas – FCECON-AM. Esta, por sua vez, é uma instituição pública de referência em Oncologia da Amazônia Ocidental, situada na zona centro-oeste da cidade de Manaus, que além de atender a população do estado do Amazonas, ainda presta serviços para a população do sul do Pará, Roraima, Rondônia e Acre. Além disso, é o único local a oferecer serviços de radioterapia na Região Norte, sendo considerada de referência neste quesito, também.

GRUPO II: constituído por 164 mulheres, caracterizadas por apresentarem citologia inflamatória, consideradas normal por não apresentarem lesões pré-malignas e malignas. Estas mulheres foram atendidas pelo serviço de ginecologia da Policlínica Castelo Branco que, por sua vez, é considerada modelo de sistema ambulatorial, por oferecer atendimento em diversas especialidades como pneumologia, urologia, dermatologia, cardiologia, gastroenterologia e otorrinolaringologia, além da ginecologia e serviços de ultrassonografia, fisioterapia, psicologia, nutrição, vacinação e curativos. Está situada na zona centro-sul de Manaus, e presta atendimento a pacientes encaminhados de todas as Unidades Básicas de Saúde distribuídas pela cidade.

5.1 Fatores de Risco

Sabe-se que a presença do HPV é um dos fatores mais importantes e necessários para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. No entanto, sozinho este vírus não tem ação carcinogênica. Este fato leva a crer que a ação de fatores de risco juntamente com o vírus do HPV é necessária para este processo.

Diversos estudos têm demonstrado que fatores como o hábito de fumar, a multiparidade, o uso prolongado de anticoncepcional e infecções por outras DST podem triplicar o risco do desenvolvimento de lesões pré-malignas ou até mesmo de um câncer entre mulheres infectadas com tipos oncogênicos de HPV (SMITH et al., 2003; ICESCC, 2006a; ICESCC, 2006b).

Muñoz et al. (2006) destaca três grupos de potenciais co-fatores na carcinogênese cervical. Os ambientais (citados anteriormente), os fatores virais (infecções por tipo de HPV específico, co-infecções por tipos de HPV diferentes, carga viral, variantes do HPV e integração viral), e os fatores do hospedeiro (fatores genéticos, hormônios endógenos e outros fatores relacionados à resposta imune).

Porém, o papel que cada um desses fatores desempenha na carcinogênese ainda é desconhecido.

Neste estudo foi encontrada associação entre os fatores paridade e infecções por outras DST e a presença de lesões, em comparação com os dois grupos estudados (TABELAS 17 e 18).

O intervalo de idade da primeira gestação e o número de gestações encontradas entre as mulheres do GRUPO I (16 – 20 anos e 5 partos) foi mais precoce e maior do que os encontrados entre as mulheres do GRUPO II (17 – 24 anos e 3 partos).

Resultados de estudos realizados pela ICESCC – The International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Câncer (2006) demonstram que o risco relativo para o Câncer Cervical aumenta de acordo com o número de gestações e início precoce da atividade sexual.

Em estudo realizado pela IARC (International Agency for Research on Câncer), Muñoz et al. (2002) demonstra que mulheres com sete ou mais gestações têm um risco quatro vezes maior de desenvolver um câncer cervical do que mulheres que nunca engravidaram (OR = 3,82, 95% CI: 2,66 – 5,48). Além disso, Hildesheim et al. (2001) observaram um risco significativamente maior de desenvolvimento de lesões do tipo HSIL e CA associado ao número de nascimentos, num estudo realizado na Costa Rica.

Esse aumento significativo associado a uma maior quantidade de gestações pode acontecer devido à manutenção da zona de transformação por muito tempo. Este mecanismo pode facilitar a infecção pelo HPV, além disso, as trocas hormonais induzidas pela gestação poderiam estar relacionadas à persistência ou à progressão dessa infecção (MUÑOZ et al., 2006).

Muitos estudos têm se dedicado ao entendimento do papel específico de outras DST, na carcinogênese induzida pelo HPV. A maioria destes estudos demonstra a relação da *C. trachomatis* na carcinogênese cervical, no entanto, o mecanismo pelo qual isso acontece é pouco esclarecido.

No presente estudo foi possível observar a associação da infecção por *C. trachomatis* (CT) e co-infecção (CT/HPV) com a presença de lesões (TABELA 18).

Smith et al. (2002b), em uma análise baseada em dois estudos do tipo caso-controle envolvendo 499 mulheres com câncer cervical e 539 controles do Brasil e Filipinas, demonstraram que entre mulheres HPV-positivas, a positividade para *C. trachomatis* revela um risco duas vezes maior de desenvolvimento do câncer cervical do que entre mulheres

HPV-negativas (OR = 2,1, 95% CI: 1,1 – 4,0) e destacam o fato de que infecções por *C. trachomatis* podem induzir uma metaplasia imatura e tanto o HPV quanto a *C. trachomatis* podem infectar o tecido metaplásico, onde surge a neoplasia cervical. Assim sendo, uma infecção crônica de *C. trachomatis* em conjunto com o HPV podem ser um dos fatores de risco mais relevantes na mediação do câncer cervical.

A hipótese de que a infecção por *C. trachomatis* teria um papel facilitador na carcinogênese cervical pela ação das *heat shock proteins 60* (HSP60) é fortemente defendida por alguns estudos. Essas proteínas são sintetizadas pela *C. trachomatis* e podem apresentar uma ação anti-apoptótica durante uma infecção por esta bactéria, processo esse que facilitaria a atuação das oncoproteínas em células simultaneamente infectadas pelo HPV 16 ou 18. Porém, este mecanismo ainda não foi completamente elucidado (DI FELICE et al., 2005; CAPELLO et al., 2009).

Outros fatores como idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais e histórias de DST estão relacionadas com a infecção do HPV e não são considerados como fatores de risco na carcinogênese induzida pelo vírus.

Neste estudo foi observado que a maioria das infecções por HPV e *C. trachomatis* ocorreram em mulheres com lesões, com idade entre 21 – 40 anos, que tiveram início da atividade sexual entre 15 – 17 anos, são casadas, possuem baixa escolaridade e renda familiar. Esses resultados mostram-se de acordo com os encontrados nos mais diversos estudos de detecção desses patógenos (TAMIM et al., 2002; NONNENMACHER et al., 2002; MOLANO et al., 2003; FINAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; FEDRIZZI et al., 2008; FERNANDES et al., 2010).

5.2 Infecção por HPV

A detecção e genotipagem do HPV nas mulheres do GRUPO I foram realizadas por Ferreira (2007). Para a detecção do DNA de HPV nessas amostras, a pesquisadora utilizou a técnica *Nested-PCR*, afim de aumentar a sensibilidade de sua reação, já que, utilizando somente os *primers* MY09/MY11, 95,2% de suas amostras resultariam em um diagnóstico falso-negativo.

O DNA do HPV foi detectado em 94,74% (144/152) das mulheres com lesão (GRUPO I). Estes resultados corroboram com as prevalências descritas na literatura que variam de 14,5 – 97% em mulheres que apresentam lesões (GIULIANO et al., 2001; MOLANO et al., 2003; GOLIJOW et al., 2005; DE PAULA et al., 2007; PAESI et al., 2009).

O vírus do HPV foi detectado em 100% das lesões dos tipos LSIL, ADENOCARCINOMA e CA (carcinoma invasor) e em 93,04% das lesões do tipo HSIL, encontradas no presente estudo.

Este achado corrobora com os resultados do estudo de De Paula et al. (2007) que encontraram o DNA de HPV em LSIL – 71% (22/31), HSIL – 74,1% (20/27) e CA – 100% (4/4). Em seu estudo, Conesa-Zamora et al. (2009) descreveram uma positividade de 87,2% HPV em mulheres que apresentaram lesões do tipo HSIL.

Golijow et al. (2005), detectaram uma prevalência de 97% para o HPV, por meio da técnica *Nested-PCR*, em mulheres que apresentaram lesões, na Argentina. Conesa-Zamora et al. (2009), na Espanha, descreveram uma prevalência de 74,1% neste mesmo tipo de amostra, através de PCR, em estudo realizado com 458 mulheres. Os tipos de HPV mais frequentes, neste mesmo estudo, foram o HPV 16, 53 e 58.

No Brasil, De Paula et al. (2007) encontraram prevalências de 73,3% para mulheres com lesão, em Minas Gerais. Outro estudo, realizado por Fernandes et al. (2009), revelou uma prevalência de 67,4%, em Natal-RN.

Em Manaus, Castro (2002) encontrou uma positividade de 39,28% para o HPV em mulheres com lesões, por meio de PCR e utilizando apenas os *primers* MY09/MY11. O tipo de HPV mais freqüente encontrado pela pesquisadora foi o HPV 16. Neste estudo, a baixa prevalência pode estar relacionada ao fato de a pesquisadora não ter utilizado a técnica *Nested-PCR*.

No presente estudo foi possível a identificação, via seqüenciamento, de 10 tipos diferentes do HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 53, 56, 58 e 66), para as amostras do GRUPO I. Quase todos estes tipos são considerados de alto risco, com exceção apenas dos tipos 53 e 66, considerados de provável alto risco (SETTHEETHAM-ISHIDA et al., 2005; MUÑOZ et al., 2006).

Nas mulheres do GRUPO I, o HPV 16 foi o tipo mais freqüente e foi encontrado em 82,65% (100/121) das amostras. Foi também o mais encontrado nos quatro grupos de lesões (LSIL – 57,14%, HSIL – 66,7%, ADENOCARCINOMA – 33,33% e CA – 73,43%).

Para a detecção do HPV, nas amostras do GRUPO II, optou-se por utilizar a mesma técnica utilizada por Ferreira (2007), *Nested-PCR*. Sendo assim, foi possível detectar o DNA deste vírus em 48,78% (80/164) das amostras. Utilizando-se somente os *primers* MY09/MY11 seria possível a detecção de HPV em apenas 13,41% (22/164), o que confirma a necessidade de se empregar uma técnica mais sensível, que aumente a detecção do HPV, demonstrando, assim, resultados reais.

Os resultados em relação à detecção do DNA de HPV estão de acordo com as prevalências relatadas para mulheres com citologia normal, que variam de 3 – 51% (WALLIN

et al., 2002; NONNENMACHER et al., 2002; GOLIJOW et al., 2005; DE PAULA et al., 2007; TÁBORA et al., 2009).

Um estudo realizado por Golijow et al. (2005) revelou uma prevalência de 30,4% para o HPV em mulheres com citologia normal, na Argentina. Conesa-Zamora et al. (2009) relataram prevalência de 49,7%, para a Espanha e, em Honduras, Tábora et al. (2009) demonstraram prevalência de 51% do DNA de HPV em mulheres com essa mesma característica.

Para o Brasil, De Paula et al. (2007), relataram uma positividade de 25,71% do DNA de HPV para mulheres com citologia normal, em Minas Gerais. Outro estudo realizado por Fernandes et al. (2010) revelou prevalência 24,5%, em Natal-RN e Oliveira et al. (2010) relataram uma prevalência de 27,4%, em estudo utilizando amostras de mulheres com idades entre 14 e 26 anos, no Rio de Janeiro. Em Manaus, Castro (2002) encontrou uma positividade de 6,45% em mulheres com citologia normal.

Por seqüenciamento, foi possível encontrar 7 tipos diferentes de HPV, nas mulheres do GRUPO II (HPV 6, 11, 16, 31, 53, 56, 62). O HPV 16 foi o tipo mais freqüente encontrado neste grupo e é considerado de alto risco juntamente com os HPV 31 e 56, os tipos HPV 6 e 11 são considerados de baixo risco, e os tipos 53 e 62 são considerados de provável alto risco e risco indeterminado, respectivamente (SETTHEETHAM-ISHIDA et al., 2005; MUÑOZ et al., 2006).

Como se esperava, a prevalência da infecção por HPV entre as mulheres com lesão (94,74%) foi bem mais alta que a prevalência encontrada entre as mulheres com citologia normal. No entanto, não se esperava encontrar uma prevalência tão alta para as mulheres com citologia normal (48,78%).

O tipo de HPV mais freqüente tanto no GRUPO I quanto no GRUPO II, foi o HPV 16.

Os tipos de HPV 16 e 18 têm sido apontados, durante anos, como os tipos mais comumente encontrados em casos de câncer cervical e, por isso, vêm sendo considerados como os responsáveis por cerca de 90% de todos os casos de câncer deste tipo no mundo inteiro (MUÑOZ et al., 2006; BURK et al., 2009).

Estudos realizados por Clifford et al. (2003) e MUÑOZ et al. (2004), do tipo caso-controle envolvendo 10.058 e 3.607 casos de câncer cervical, respectivamente, demonstraram os HPV 16, 18, 31, 33, 35 e 45 entre os tipos mais comumente encontrados em mulheres com este tipo de câncer.

Um estudo de meta-análise, realizado por Smith et al. (2007) incluindo dados coletados de 138 estudos envolvendo câncer cervical e 85 estudos envolvendo HSIL, realizados entre 2002 e 2006, demonstrou dados para 14.595 casos de câncer e 7.094 casos de HSIL. Estes resultados revelaram uma prevalência de 87% de HPV nos casos de câncer. O tipo de HPV mais encontrado nos casos de câncer de todos os continentes estudados foi o HPV 16 (que teve variação de 52% na Ásia a 58% na Europa), seguido do HPV 18 (que teve variação de 13% na América Central e América do Sul a 22% na América do Norte), demonstrando que 70% de todos os casos de câncer foram associados à infecção pelo HPV 16 (55%) ou HPV 18 (15%).

Alguns estudos têm relatado o alto risco que mulheres HPV-positivas, aparentemente sem qualquer lesão citológica, têm de desenvolver lesões dos tipos LSIL e HSIL. Esse risco aumenta quando as infecções por HPV são causadas pelos HPV 16 e 18 ou por tipos relacionados filogeneticamente a eles. Esses autores observaram o desenvolvimento de lesões deste tipo dois anos após a detecção do HPV. Isso indica que, nem sempre é necessário se ter uma infecção por tempo prolongado. Essas lesões podem se manifestar precocemente, inclusive em mulheres jovens (KHAN et al., 2005; WINER et al., 2005; MUÑOZ et al., 2006).

No presente estudo, entre as amostras HPV 16-positivas de mulheres com citologia normal (GRUPO II), foi possível encontrar compatibilidade com a seqüência do HPV 16 Am, depositado no GenBank (HM057182.1 - Human papillomavirus type 16 isolate Amazonian, complete genome). Esta seqüência foi isolada, de uma amostra HPV-positiva que faz parte do grupo de mulheres que apresentam lesões (GRUPO I), pelo pesquisador Filho (2010).

5.3 Infecção por *C. trachomatis*

As diferenças existentes entre as prevalências encontradas para a *C. trachomatis* podem estar associadas ao método de detecção empregado ou até mesmo ao tipo amostral utilizado nestes estudos já que, em pacientes crônicos o número de cópias desta bactéria na cérvix uterina diminui podendo, este, ser um fator limitante no diagnóstico, como relatado por Barlow et al. (2001).

As maiores prevalências encontradas na literatura para a infecção por *C. trachomatis* têm sido relatadas para adolescentes e jovens em diversos estudos (SAMOFF et al., 2005; KUČINSKIENĖ et al., 2006; NEWMAN; BERMAN, 2008).

Neste estudo, a detecção de *C. trachomatis*, tanto no GRUPO I quanto no GRUPO II, foi realizada por meio da PCR. Esta técnica possui sensibilidade em torno de 75% e especificidade entre 95 – 99%. No entanto, essa especificidade e sensibilidade dependem dos iniciadores utilizados (SEADI et al., 2002; MICHELON et al., 2005). Quando utilizados, na PCR, iniciadores que têm como alvo o DNA plasmidial da *C. trachomatis*, esta técnica se torna mais sensível do que quando utilizados iniciadores que têm como alvo o gene codificador da MOMP, já que a bactéria pode conter de 7-10 plasmídeos e apenas uma cópia do gene codificador da MOMP (SEADI et al., 2002; PAAVONEEN et al., 1999).

Foram utilizados os *primers* KL1 e KL2, que têm como alvo o DNA plasmidial, neste estudo. Além disso, utilizamos como enzima a *Platinum® Taq* DNA Polimerase *High Fidelity*. Esta enzima, além de possuir especificidade e fidelidade seis vezes maior do que a *Taq* polimerase comum, também possui atividade revisora de exonuclease (3'-5') e permite desde a amplificação de fragmentos menores até fragmentos com 15 kb (SCHUSTER et al., 1998; HU et al., 2003; INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES, 2003).

Sendo assim, o DNA de *C. trachomatis* foi encontrado em 26,97% (41/152) das mulheres do GRUPO I. Este resultado condiz com as prevalências relatadas por estudos anteriores, nos quais se observa uma variação de 5% – 39% (MOLANO et al., 2003; GOLIJOW et al., 2005; DE PAULA et al., 2007; MENÉNDEZ et al., 2010).

Golijow et al. (2005) detectaram, por PCR, uma positividade de 39,5% para *C. trachomatis*, na Argentina e Menéndez et al. (2010), por meio de Captura Híbrida, demonstraram uma prevalência de 8%, desta bactéria, em Moçambique, ambos para mulheres com lesões.

Entre as mulheres com lesões (GRUPO I), o DNA de *C. trachomatis* foi detectado apenas nas lesões dos tipos LSIL – 14,28% (2/14), HSIL – 30,7% (35/114) e CA – 19,04% (4/21), tendo como exceção as lesões do tipo ADENOCARCINOMA. Este resultado pode estar relacionado ao fato de não termos um número representativo deste tipo de lesão entre as mulheres que compõem o GRUPO I.

Golijow et al. (2005) detectaram o DNA de *C. trachomatis* em lesões do tipo LSIL – 41,8% (33/79), HSIL – 46,7% (35/75) e CA – 20% (7/35), em estudo realizado na Argentina.

De Paula et al. (2007) detectaram DNA de *C. trachomatis* em lesões do tipo LSIL – 9,7% (3/31) e HSIL – (2/27), mas não conseguiram detectar nas amostras de carcinoma epidermóide invasivo, por ter apenas quatro lesões deste tipo envolvidas em seu estudo.

Quanto às mulheres do GRUPO II, a prevalência encontrada foi de 3,05% (5/164). As prevalências descritas na literatura para este tipo de amostra variam de 2,2% - 20,7% (SANTOS et al., 2003; IGANSI, 2005; DE PAULA et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; FERNANDES et al., 2010).

No Brasil, um estudo realizado pelo Ministério da Saúde (2008), envolvendo 2.032 mulheres que procuraram serviços de DST nas cidades de Fortaleza, Goiânia, Manaus, Porto Alegre e São Paulo encontrou prevalências de 2,2%, 5,8%, 10%, 12,1% e 5,8%, respectivamente, por meio de Captura Híbrida.

Santos et al. (2003) em estudo realizado também com mulheres que procuraram serviços de DST em Manaus, relataram uma prevalência de 20,7%, por meio da PCR.

Em Porto Alegre, Igansi (2005) encontrou uma prevalência de 12,6% utilizando a técnica de Captura Híbrida e Fernandes et al. (2010) descreveram uma prevalência de 13,5% para *C. trachomatis* neste mesmo tipo de amostra, em São Paulo.

5.4 Co-infecção por HPV e *C. trachomatis*

Quanto à co-infecção por HPV e *C. trachomatis*, este estudo detectou uma prevalência de 27,1% (39/144) em mulheres que apresentaram lesões (GRUPO I).

Dentre as mulheres co-infectadas deste grupo, 84,62% (33/39) apresentavam lesões do tipo HSIL, sendo que, 63,63% (21/33) estavam infectadas pelo HPV 16, seguidas de 12,12% (4/33) que estavam infectadas pelo HPV 18, uma porcentagem de 6,06% (2/33) infectadas pelo HPV 45, uma amostra infectada pelo HPV 33 e outra pelo HPV 58. Em mulheres que apresentavam lesão do tipo LSIL, o HPV foi detectado em 50% das amostras e em mulheres que apresentavam lesão do tipo CA, o HPV 16 foi encontrado em 75% (3/4).

Quanto à co-infecção por HPV e *C. trachomatis* entre as mulheres do GRUPO II, neste estudo, foi encontrada uma prevalência de 3,75% (3/80). Estes resultados possuem grande semelhança com os resultados encontrados por De Paula et al. (2007), que descreveram uma prevalência de 4% para um grupo de mulheres com citologia normal, em Minas Gerais.

Igansi (2005) descreveu uma positividade de 6,5% para mulheres assintomáticas, em Porto Alegre. Golijow et al. (2005), por sua vez, destacaram uma prevalência de 12,5% em um grupo de mulheres que apresentavam citologia normal, na Argentina.

Mesmo havendo uma gama de estudos relacionados às prevalências de infecções por HPV e *C. trachomatis*, essas prevalências são medidas separadamente. Na maioria destes estudos, não são relatadas as prevalências para a co-infecção entre estes patógenos.

O presente estudo não encontrou associação entre os fatores sócio-econômicos-ambientais e clínicos e a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* (TABELA 10). Para as mulheres que apresentaram lesões (GRUPO I), no entanto, foi encontrada associação com o tipo de HPV (TABELA 11), demonstrando que o HPV 16 esteve presente em 64,10% (25/39) das mulheres co-infectadas. É válido destacar que 53,85% (21/33) dessas mulheres apresentaram lesões do tipo HSIL.

Neste estudo foi possível avaliar a situação de um número significativo de mulheres atendidas pela rede pública de saúde, através de métodos sensíveis da biologia molecular, o que evidenciou uma alta frequência de HPV, *C. trachomatis* e a co-infecção destes patógenos. Este quadro corrobora com as altas taxas de incidência do câncer cervical no Brasil e, principalmente na Região Norte, onde a incidência observada para este tipo de câncer é ainda maior do que no restante do país.

Os resultados deste estudo reforçam a importância de medidas preventivas mais urgentes para o controle dessas infecções a fim de reduzir seu impacto e conseqüências na população como um todo (INCA, 2010a).

Este estudo ainda evidencia a extrema importância do uso de técnicas mais sensíveis, como as técnicas da biologia molecular, aliado aos exames rotineiros de prevenção dessas doenças.

3. CONCLUSÕES

1. A infecção pelo HPV foi encontrada em 94,74% (144/152) das mulheres do GRUPO I (com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero) e em 48,78% (80/164) das mulheres do GRUPO II (citopatológico inflamatório);
2. A infecção por *C. trachomatis* foi encontrada em 26,97% (41/152) das mulheres do GRUPO I e em 3,05% (5/164) das mulheres do GRUPO II;
3. A co-infecção por HPV e *C. trachomatis* foi observada em 27,1% (39/144) das mulheres do GRUPO I e em 3,75% (3/80) das mulheres do GRUPO II;
4. Foram identificados os tipos de HPV 16, 18, 33, 31, 45, 35, 53, 56, 58 e 66 entre as mulheres do GRUPO I;
5. Foram identificados os tipos de HPV 6, 11, 16, 31, 53, 56 e 62 entre as mulheres do GRUPO II;
6. O tipo de HPV mais freqüente encontrado foi o HPV 16. Entre as mulheres do GRUPO I, esteve presente em 82,65% (100/121) e entre as mulheres do GRUPO II, esteve presente em 90,91% (60/66);
7. O HPV 16 foi encontrado em 57,14% (8/14) das lesões do tipo LSIL, em 66,7% (76/114) das lesões do tipo HSIL, em 33,33% (1/3) das lesões do tipo ADENOCARCINOMA e em 71,43% (15/21) das lesões do tipo CA;

8. Foi encontrada co-infecção por HPV e *C. trachomatis* nas lesões do tipo LSIL (com HPV 16), HSIL (com HPV 16, 18, 33, 45 e 58) e CA (com HPV 16);
9. Não foi possível encontrar associação da co-infecção por HPV e *C. trachomatis* com os fatores sócio-econômicos-ambientais e clínicos, com exceção da variável Tipo de HPV ($p=0,0424$), que associa o HPV 16 a 64,10% (25/39) das mulheres co-infectadas, no GRUPO I.
10. Não foi possível verificar a associação entre a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* com os fatores sócio-econômicos-ambientais e clínicos entre as mulheres do GRUPO II.

BIBLIOGRAFIA

AL-DARAJI, W.I.; SMITH, J.H.F. Infection and Cervical Neoplasia: Facts and Fiction. **Int J Clin Exp Pathol**, v.2, p.48-64, 2009.

ALENCAR, A.A.F.; FERREIRA, L.C.L.; LOUREIRO, J.A.S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta em esfregaços endocervicais. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v.103, n.6, p.199–203, 1993.

ALFAIA, A.P.B.B. Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Gestantes: Prevalência e Importância Pré-natal. Manaus: UFAM, 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, p.3389- 3402, 1997.

ARBYN, M.; BUNTINX, F.; VAN RANST, M.; PARASKEVAIDIS, E.; MARTIN-HIRSCH, P ; DILLNER, J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v.96, n.4, p.280-293, 2004.

BAGARELLI, B.; OLIANI, A.H. Tipagem e Estado Físico de Papilomavírus Humano por Hibridização *in situ* em lesões intra-epiteliais do colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.26, n.1, p.59-64, 2004.

BANDEA, C.I.; KUBOTA, K.; BROWN, T.M.; KILMARX, P.H.; BHULLAR, V.; YANPAISARN, S.; CHAISILWATTANA, P.; SIRIWASIN, W.; BALCK, C.M. Typing os *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene. **Sexually Transmitted Infections**, v.77, p.419-424, 2001.

BARLOW, R.E.L.; COOKE, I.D.; ODUKOYA, OL.; HEATLEY, M.K.; JENKINS, J.; NARAYANSINGH, G.; RAMSEWAK, S.S.; ELEY, A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridisation. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 902-908, 2001.

BARROS, N.K.S.; ALVES, R.R.F.; CARNEIRO, M.A.S.; RABELO-SANTOS, S.H. O papel da associação das infecções por Papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* no desenvolvimento do câncer cervical. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.2, p.114-118, 2007.

BASEMAN, J.G.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of clinical virology**, v.32, p.16-24, 2005.

BAUER, H. M.; MANOS, M. M. **PCR Detection of genital human papillomavirus**. In: Applications - Viral Pathogens, 407-413p, 1998.

BERNARD, H.U; CHAN, SY.; 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 papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, v.170, p.1077-85, 1994.

BIGIO, C.T.; BARBOSA, F.A.; CAVALCANTI, S.M.B. Detecção e tipagem viral para papilomavírus humano: progressos recentes e perspectivas clínicas. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.14, n.4, p.32-35, 2002.

BLACK, M.C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clin Microbiol Rev**, v.10, p.160-84, 1997.

BOSCH F.X.; LORINCZ A.; MUNOZ N.; MEIJER C.J.; SHAH K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v.55, p.244-265, 2002.

BOSCH, F.X.; de SANJOSE, S: The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Dis Markers**, v.23, p.213-227, 2007.

BOSHART, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; KLEINHEINZ, A.; SCHEURLLEN, W.; zur HAUSEN, H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **EMBO Journal**, v.3, n.5, p.1151-1157, 1984.

BRENNNA, S.M.; SYRJANEN, K.J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV) – associated cervical carcinogenesis. **São Paulo Med J**, v.121, p.128-132, 2003.

BRINGHENTI, M.E.Z.; GONÇALVES, T.L.; RODRIGUES, Y.B. HPV na gênese de lesões cérvico-uterinas - Métodos diagnósticos (Citopatologia – Tipagem viral). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.33, n.3, p.117-120, 2001.

BROWN, M.L.; LIPSCOMB, J.; SNYDER, C. The burden of illness of cancer: economic cost and quality of life. **Annual Review of Public Health**, v.22; p.91-113, 2001.

BURD, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n. 1 p.1S-17S, 2003.

BURK, R.D.; CHEN, Z.; van DOORSLAER, K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v.12, p.281-290, 2009.

CAMARA, G.N.N.L.; CRUZ, M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**, v.1, n.1, p.149-158, 2003a.

CAMARA, G.N.N.L.; CRUZ, M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. Os papilomavírus humanos – HPV: Carcinogênese e Imunogênese. **Universitas Ciências da Saúde**, v.1, n.1, p.159-168, 2003b.

CAPPELLO, F.; MACARIO, E.C.; DI FELICE, V.; ZUMMO, G.; MACARIO, A.J.L. *Chlamydia trachomatis* infection and Anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. **PLOS pathogens**, v.5, n.8, p.1-9, 2005.

CARNEIRO, S.S.; MOREIRA, M.A.R.; NETTO, J.C.A. HPV e câncer do colo uterino. **Revista de Patologia Tropical**, n.1, p.1-20, 2004.

CASTELLSAGUE, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v.31, p.20-8, 2003.

CASTLE, P. E.; GIULIANO, A. R. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v.31, p.29-34, 2003.

CASTRO, M.M. Detecção do **Papilomavírus Humano-HPV em esfregaços endocervicais de mulheres que procuram serviços de ginecologia em Manaus**. Manaus: UFAM, 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal do Amazonas, 2002.

CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDOL, G.; PASSOS, M.R.L.; OLIVEIRA, L.H.S. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **J Infect**, v.40, p.80-87, 2000.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. **MMWR**, v.51(RR-6), p.30-52, 2002.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Surveillance 2008. Trends in Reportable Sexually Transmitted Diseases in the United States, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/stats/stats08/trends.htm>>. Acesso em: 05 out 2010.

CLIFFORD, G.M.; SMITH, J.S.; PLUMMER, M.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human Papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v.88, p.63-73, 2003.

CONESA-ZAMORA, P.; ORTIZ-REINA, S.; MOYA-BIOSCA, J.; DOMÉNECH-PERIS, A.; ORANTES-CASADO, F.J.; PÉREZ-GUILLERMO, M.; EGEA-CORTINES, M. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. **BMC Infectious Diseases**, v.9, p.124, 2009.

CUSCHIERI, K.S.; HORNE, A.W.; SZAREWSKI, A.; CUBIE, H.A. Public awareness of human papillomavirus. **Journal of Medical Screening**, v.13, n.4, p.201-207, 2006.

CUZICK, J.; CLAVEL, C.; PETRY, K.U.; MEIJER, C.J.L.M.; HOYER, H.; RATNAM, S.; SZAREWSKI, A.; BIREMBAUT, P.; KULASINGAM, S.; SASIENI, P.; IFTNER, T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. **Int J Cancer**, v.119, p.1095-101, 2006.

DE LIMA SOARES, V.; DE MESQUITA, A.M.T.; CAVALCANTE, F.G.T.; SILVA, Z.P.; HORA, V.; DIEDRICH, T.; DE CARVALHO, P.S.; MELO, P.G.; DACAL, A.R.C.; MAIA, E.F.C.; FELDMIEIER, H. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: Prevalence, morbidity and risk factors. **Trop Med Int Health**, v.8, p.595-603, 2003.

DE PAULA, F.D.F.; FERNANDES, A.P.; DO CARMO, B.B.; VIEIRA, D.C.D.; DUTRA, M.S.; SANTOS, C.G.M.; SOUZA, M.C.M.; ANDRADE, T.C.A.; VAGO, A.R.; FERNANDES, P.A. Molecular Detection of *Chlamydia trachomatis* and HPV Infections in Cervical Samples With Normal and Abnormal Cytopathological Findings. **Diagnostic Cytopathology**, v.35, n.4, p.198-202, 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.

DI FELICE, V.; DAVID, S.; CAPELLO, F.; FARINA, F.; ZUMMO, G. Visions & Reflections: Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? **Cell Mol Life Sci**, v.62, p.4-9, 2005.

DOORBAR, J. The Papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v.32, p.7-15, 2005.

DURST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; zur HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, n.12, p.3812-3815, 1983.

FEDRIZZI, E.N.; SCHULP, C.G.; MENEZES, M.E.; OCAMPOS, M. Infecção pelo Papillomavirus Humano em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **J Bras Doenças Sex Transm**, v.20, n.2, p.73-79, 2008.

FERNANDES, J.V.; MEISSNER, R.V.; CARVALHO, M.G.F.; FERNANDES, T.A.A.M., AZEVEDO, P.R.M.; SOBRINHO, J.S.; PRADO, J.C.M.; VILLA, L.L. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Research Notes**, v.3, p.96, 2010.

FERREIRA, J.R.D. **Detecção da infecção pelo HPV e do polimorfismo da proteína p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas**. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

FILHO, R.A.A.B. Clonagem, Sequenciamento e estudos moleculares do genoma de HPV 16 isolado na Amazônia. Manaus, UFAM, 2010. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica), Universidade Federal do Amazonas, 2010.

FINAN, R.R.; TAMIM, H.; ALMAWI, W.Y. Identification of *Chlamydia trachomatis* DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 266, p.168-171, 2002.

FINAN, R.R.; MUSHARRAFIEH, U.; ALMAWI, W.Y. Detection of *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative women. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, p.927-930, 2006.

FISCHER, N. Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v.23, p.247-50, 2002.

FREITAS, N.S.L. **Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes, Manaus – Amazonas.** UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2007.

GAYDOS, C.A.; QUINN, T.C. Urine nucleid acid amplification tests for the diagnosis of sexually transmitted infections in clinical practice. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, p.55-66, 2005.

GIRALDO, P.C.; SIMÕES, J.A. **Clamídia e micoplasmas.** In: Halbe HW. Tratado de ginecologia. 3a ed., São Paulo: Roca, p.1047-58, 2000.

GIULIANO, A.R.; DENMAN, C.; ZAPIEN, J.G.; HENZE, J.L.N.; ORTEGA, L.; DJAMBAZOV, B.; GALAZ, E.M.B.; HATCH, K. Design and results of the USA – Mexico Border Human Papillomavirus (HPV), Cervical Displasia, and *Chlamydia trachomatis*, v.9, n.3, p.172-181, 2001.

GOLIJOW, C.D.; ABBA, M.C.; MOURÓN, S.A.; LANGUES, R.B.; DULOUT, F.N.; SMITH, J.S. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections cervical disease in Argentine women. **Gynecologic Oncology**, v.96, p.181-186, 2005.

GROSS, G.E.; BARRASSO, R. Infecção por Papilomavírus Humano. **Atlas clínico de HPV.** Porto Alegre: Artmed, p.1-287, 1999.

GUASCHINO, S.; SETA, F. Update on *Chlamydia trachomatis*. **Annals New York Academy of Sciences**, v.900, p.293-300, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMDAD F. ; ORFILA J. ; BOULANGER J.C. ; EB, F. *Chlamydia trachomatis* urogenital infections in women. Best diagnosis approaches. **Gynecol Obstet Fertil**, v.32, p.1064-74, 2004.

HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; CASTLE, P. E.; WACHOLDER, S.; BRATTI, M. C.; SHERMAN, M.E.; LORINCZ, A.T.; BURK, R.D.; MORALES, J.; RODRIGUES, A.C.; HELGESEN, K.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; BALMACEDA, I.; GREENBERG, M.; SCHIFFMAN, M. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **Br J Cancer**, v.84, n.9, p.1219-26, 2001.

HU, E.B.; ZHENG, W.; STASSINOPOULOS, A; LEE, J.E. Increased specific amplification and flexibility of Accuprime™ *Taq DNA Polymerase High Fidelity* in PCR. **Focus**, v.25.3, p.15-17, 2003.

HWANG, T.S.; JEONG, J.K.; PARK, M.; HAN, H.S.; CHOI, H.K.; PARK, T.S. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. **Gynecol Oncol**, v.90, p.51-56, 2003.

IARC: International Agency for Research on Cancer. **Cervical Cancer**. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php>>. Acesso em: 14 out 2010a.

IARC: International Agency for Research on Cancer. **Globocan, 2008: Incidence and Mortality Worldwide in 2008**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 04 out 2010b.

ICESCC (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13 541 women with carcinoma of the cervix and 23 017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **Int J Cancer**, v.118, p.1481–95, 2006a.

ICESCC (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer). Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16 563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **Int J Câncer**, v.119, p.1108–24, 2006b.

IGANSI, C.N. Prevalência de Papilomavírus Humano (HPV) e Chlamydia trachomatis e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, Brasil. Porto Alegre: UFRS, 2005. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). **Câncer de colo do útero**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5> . Acesso em: 04 out 2010a.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). **HPV**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327>. Acesso em: 17 out 2010b.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*, 2003.

IPOPORTO (Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE). **Características do HPV**. Disponível em: <<http://www.ipoport. min-saude.pt/formacaoensino/hpv2.htm>>. Acesso em: 10 nov 2010.

JACKSON B. Relative cost-effectiveness of different tests for *Chlamydia trachomatis*. **Ann Intern Med**, v.142, p.308, 2005.

JANICEK, M.F.; AVERETTE, H.E. Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics. **CA Cancer J Clin**, v.51, p.92-114, 2001.

JORDÃO, A.V.; RUGGERI, L.S.; CHIUCHETA, G.F.R.; PIVA, S.; CONSOLARO, M.E.L. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.1, p.81-89, 2003.

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 Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, v.23, n.3, p.731-737, 2001.

KAUFMAN, R.H.; ADAM, E.; VONKA, V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. **Clin Obstet Gynecol**, v.43, p.363-380, 2000.

KELLEY, M.L.; KEIGER, K.E.; LEE, C.J.; HUIBREGTSE, J.M. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. **J Virol**, v.79, p.3737-3747, 2005.

KELLOGG, N.D.; BAILLARGEON, J.; LUKEFAHR, J.L. Comparison of nucleic acid amplification tests and culture techniques in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in victims of suspected child sexual abuse. **J Pediatr Adolesc Gynecol**, v.17, p.331-9, 2004.

KHAN, M.J.; CASTLE, P.E.; LORINCZ, A.T.; WALCHOLDER, S.; SHERMAN, M.; SCOTT, D.R.; RUSH, B.B.; GLASS, A.G.; SCHIFFMAN, M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with Human Papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific hpv testing in clinical practice. **J Natl Cancer Inst**, v.97, p.1072-1079, 2005.

KUČINSKIENĖ, V.; ŠUTAITĖ, I.; VALIUKEVIČIENĖ, S.; MILAŠAUSKIENĖ, Z.; DOMEIKA, M. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. **Medicina (Kaunas)**, v. 42, n. 11, p. 885-894, 2006.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L.C.; DE LUCENA BATISTA, R.; LUBAMBO, T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int Gynecol Cancer**, v.10, p.143-150, 2000.

MAHONY, J.B.; LUINSTR, K.E.; SELLORS, J.W. ; CHERNESKY, M.A. Comparison of Plasmid and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.7, p.1753-1758, 1993.

MANDIC, A.; VUJKOV, T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? **Ann Onc**, v.15, p.197-200, 2004.

MARKOWSKA, J.; FISCHER, N.; FISCHER, Z.; WARCHOL, J.B. *Chlamydia trachomatis* infection in women with CIN and invasive uterine cervix cancer: significance of hormonal status. **Eur J Gynaecol Oncol**, v.23, p.511-13, 2002.

MENÉNDEZ, C.; CASTELLSAGUÉ, X.; RENOM, M.; SACARLAL, J.; QUINTÓ, L.; LLOVERAS, B.; KLAUSTERMEIER, J.; KORNEGAY, J.R.; SIGAUQUE, B.; BOSCH, F.X.; ALONSO, P.L.; Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and

cervical neoplasia cervical in women from a rural área of southern Mozambique. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 2010.

MICHELON, J.; BOENO, A.; CUNHA FILHO, E.V.; STEIBEL, G.; BERG, C.; TORRENS, M.C.T. Diagnóstico da infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*. **Scientia Medica**, v.15, n.2, p.115-120, 2005.

MIN-CHIH, H.; PEI-YI, T.; KOW-TONG, C.; LAN-HUI, L.; CHIEN-CHOU, C.; JIH-JIN, T.; LIANG-YIN, K.; HOUR-YOUNG, C.; SHU-YING, L. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.301-308, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. 2ª ed. Rio de Janeiro: INCA, 56p, 2006a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. BRASIL. Manual de Controle. **Doenças Sexualmente Transmissíveis. DST**. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 150p, 2006b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. BRASIL. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. Brasília: Ministério da Saúde, 124p, 2006c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Prevalência e frequências de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005**. Brasília: Ministério da Saúde, 224p, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. **DST no Brasil**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/dst-no-brasil>>. Acesso em: 07 out 2010.

MIRANDA, A.E.; GADELHA, A.M.J.; PASSOS, M.R.L. Impacto da Infecção pela *Chlamydia trachomatis* na Saúde Reprodutiva. DST. **J Bras Doenças Sex Transm**, v.15, n.1, p.53-58, 2003.

MOLANO, M.; WEIDERPASS, E.; POSSO, H.; MORRÉ, S.A.; RONDEROS, M.; FRANCESCHI, S.; ARSLAN, A. MEIJER, C.J.L.M.; MUÑOZ, N.; van der BRULE, A.J.C., ET AL. Prevalence and determinants of *Chlamydia trachomatis* infections in women from Bogotá, Colombia. **Sex transm Infect**, v.79, p.474-478, 2003.

MOODLY, C.A.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v.10, n.8, p.550-60, 2010.

MORENO, V.; BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J.; SHAH, K.V.; WALBOOMERS, J.M.; HERERO, R.; FRANCESCHI, S.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v.359, n.9312, p.1085-92, 2002.

MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J.S. SHAH, K.V.; MEIJER, C.J.L.M.; BOSCH, F.X.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v.359, n.9312, p.1093-101, 2002.

MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; SANJOSE S. HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v.348, p.518-527, 2003.

MUÑOZ, N.; BOSCH F.X.; CASTELLSAGUÉ, X.; DÍAZ, M.; SANJOSE, S.; HAMMOUDA, D.; SHAH, K.V.; MEIJER, C.J.L.M. Against which humanpapillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. **Int J Cancer**, v.111, p.278-285, 2004.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. **Vaccine**, v.24S3, p.S31-S310, 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 776 p, 2004.

NAUD, P.; MATOS, J.C.; HAMMES, L.; VETTORAZZI, J. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV). **Revista HCPA**, v.20, n.2, p.138-142, 2000.

NEWMAN, L.M.; BERMAN, S.M. Epidemiology of STD in African American communities. **Sex Transm Dis**, v.35, p.S4-12, 2008.

NGANDJIO, A.; CLERC, M.; FONKOUA, M.C.; THONNON, J.; LUNEL, F.; BÉBÉAR, C.; BIANCHI, A.; BARBEYRAC, B. Restriction endonuclease patterns of the *omp1* gene of reference Chlamydia trachomatis strains and characterization of isolates from Cameroonian students. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.47-50, 2004.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L.L.; PROLLA, J.C.; BOZZETTI, M.C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Rev Saúde Pública**, 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. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.6, p.506-12, 2008.

OLIVEIRA, L.H.S.; FERREIRA, M.D.P.L.; AUGUSTO, E.F.; MELGAÇO, F.G.; SANTOS, L.S.; CAVALCANTI, S.M.B.; ROSA, M.L.G. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, v.43, p.4-8, 2010.

ORTH, G.; FAVRE, M.; CROISSANT, O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. **J Virol**, n.24, p.108-120, 1977.

PAAVONEN, J.; EGGERT-KRUSE, W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. **Human Reproduction Update**, v.5, n.5, p.433-447, 1999.

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.

PARASKEVAIDIS, E.; MALAMOU-MITSI, V.; KOLIOPOULOS, G.; PAPPAS, L.; LOLIS, E.; GEORGIU, I.; AGNAUTIS, N.J. Expanded cytological referral criteria for colposcopy in cervical screening: comparison with human papillomavirus testing. **Gynecol Oncol**, v.82, p.355-359, 2001.

PASSOS, M.R.L.; VARELLA, R.Q. e MIRANDA, A.E. **Em foco – Chlamydia trachomatis: A Epidemia Silenciosa**. São Paulo: Ed. Phoenix, 2005. Disponível em: <<http://www.uff.br/dst/arquivos-pdf/clamidia.pdf>>. Acesso em: 7 out 2010.

PEREIRA, C.R.N.; ROSA, M.L.G.; VASCONCELOS, G.A.L.B.M.; FARIA, P.C.P. CAVALCANTI, S.M.B.; OLIVEIRA, L.H.S. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Gynecol Cancer**, v.17, p.651-660, 2007.

PEREZ, L.A. Genital HPV: Links to Cervical Cancer, Treatment and Prevention. **Clin Lab Sci**, v.14, n.3, p.183-186, 2001.

PINTO, A.P.; TULIO, S.; CRUZ, O.R. Co- fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n.1, p. 73-78, jan./mar. 2002.

PONTES, I.M.; ÂNGELO, P.C.S.; ASTOLFI FILHO, S. Desenvolvimento de Novos Marcadores Microssatélites para Análise Genética em Humanos. A Amazônia na Era Genômica e Pós-Genômica. In: 4º Encontro de Genética do Amazonas e 1º Encontro de Genética da Região Norte, 2003, Manaus. **Livro de Resumos**. Manaus: Sociedade Brasileira de Genética – Regional Amazonas, 2003. p.79.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5; p. 24-31, 2008.

RIETHMULLER, D.; SCHAAL, J.P.; MOUGIN, C. Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection génitale à papillomavirus humain. **Gynécol. Obstét. Fertil.**, v.30, p.139-146, 2002.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.E.; SILVA, I.S.B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.2, p.179-84, 2001.

RIVOIRE, W.A.; CORLETA, H.V.E.; BRUM, I.S.; CAPP, E. Biologia molecular do câncer cervical. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, v.6, n.4, p.447-451, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory Manual**, 2ª Edição. New York: Cold Spring Harbor Lab. USA, 1989.

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 of Epidemiology**, v.162, n.7, p.668-675, 2005.

SANKARANARAYANAN, R.; THARA, S.; SHARMA, A.; SHASTRI, S.; MAHÉ, C.; MUWONGE, R.; FONTANIÈRE, B.; MULTICENTRE STUDY GROUP ON CERVICAL CANCER EARLY DETECTION IN INDIA. Accuracy of conventional cytology: results from a multicentre screening study in India. **J Med Screen**, v.11, p.77-84, 2004.

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; SPARTACO, A.F. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.2, n.7, p. 91-95, 2003.

SARIAN, L.O.Z.; SANTOS, A.L.F.; DERCHAIN, S.F.M.; FIGUEREIDO, P.G.; MORAIS, S.S. Carga viral do papilomavírus humano na predição da gravidade de lesões cervicais em mulheres com atipias celulares na colpocitologia oncológica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, n.5, p.365-370, 2003.

SCHACHTER, J.; HILL, E.C.; KING, E.B.; COLEMAN, V.R.; JONES, P.; MEYER, K.F. Chlamydial infection in women with cervical dysplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v.123, p.753-7, 1975.

SCHACHTER, J.; STAMM, W.E. *Chlamydia*. In: Manual of clinical microbiology. 7.ed. Washington, D.C.: ASM Press., p.795-806, 1999.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.K. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v.31, p.14-19, 2003.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A.C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v.370, p.890-907, 2007.

SCHUSTER, D.M. et al. **Focus®**. V. 20, n. 34, 1998. In: *Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*. Disponível em: <<http://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.printMultipleSKU&p>> Acesso em: 16 nov 2010.

SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A. B. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, p.209-220, 2001.

SEADI C.F.; ORAVEC R.; POSER B.V.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **J Bras Patol Méd Lab**, v.38, p.125-33, 2002.

SETTHEETHAM-ISHIDA, W.; KANJANAVIROJKUL, N.; KULARBKAEW, C.; ISHIDA, T. Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of Northeastern Thailand. **Microbiol. Immunol**, n.49, v.5, p.417-421, 2005.

SHANTA, V.; KRISHNAMURTHI, S.; GAJALAKSHMI, C.K.; SWAMINATHAN, R.; RAVICHANDRAN, K. Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective. **J Indian Med Assoc**, v.98, n.2, p. 49-52, 2000.

SILINS, I.; RYD, W.; STRAND, A.; WANDELL, G.; TÖRNBERG, S.; HANSSON, B.G.; WANG, X.; ARNHEIM, L.; DAHL, V.; BREMELL, D.; PERSSON, K.; DILLNER, J.; RYLANDER, E. *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. **Int J Cancer**, v.116, p.110-115, 2005.

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

SMITH, J.S.; HERRERO, R.; BOSETTI, C.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; ELUF-NETO, J.; CASTELLSAGUÉ, X.; MEIJER, C.J.L.M.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; FRANCESCHI, S.; ASHLEY, R.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, v.94, n.21, p.1604-13, 2002a.

SMITH, J. S.; MUÑOZ, N.; HERRERO, R.; ELUF-NETO, J.; NGELANGEL, C.; FRANCESCHI, S.; BOSCH, F.X.; WALBOOMERS, J.M.M. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. **J Infect Dis**, v.185, n.3, p.324-31, 2002b.

SMITH, J.S.; GREEN, J.; BERRINGTON DE GONZALEZ, A.; APPLEBY, P.; PETO, J.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S.; BERAL, V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **Lancet**, v.361, p.1159–67, 2003.

SMITH J.S.; BOSETTI C.; MUÑOZ N.; HERRERO, R.; BOSCH, F.X.; ELUF-NETO, J.; MEIJER, C.J.L.M.; VAN DEN BRULE, A.J.; FRANCESCHI, S.; PEELING, R.W.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **Int J Cancer**, v.111, p.431–39, 2004.

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. **Int J Cancer**, v.121, p.621-632, 2007.

SOUZA, E.P. **Epidemiologia da infecção genital por HPV e anormalidades na citologia cervical em mulheres jovens brasileiras**. Campinas: UNICAMP, 2004. Tese (Doutorado em Tocoginecologia), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

STANLEY, M. Genital human papillomavirus infection-current and prospective therapies. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v.31, p.117-24, 2003.

TÁBORA, N.; BAKKERS, J.M.J.E.; QUINT, W.G.V.; MASSUGER, L.F.A.B.; MATUTE, J.A.; MELCHERS, W.J.G.; FERRERA, A. Human Papillomavirus infection in Honduran women with normal cytology. **Cancer Causes Control**, v.20, p.1663-1670, 2009.

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

TANG, W.K. Oncogenic human papillomavirus infection: epidemiology in local high-risk women. **Hong Kong Dermatol Venereol Bulletin**, v.10, n.4, p.160-163, 2002.

UNITED STATES. U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 2004 Incidence and Mortality. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute, 2007.

VINCE, A.; IVANISEVIC, M.; HARNI, V.; SKALKO, D.; JEREN, T. Molecular detection of human papillomavirus in woman with minor grade cervical cytologic abnormalities. **J Clin Vir**, v.20, p.91-94, 2001.

VRTAČNIK-BOKAL, E. *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus 16 and 18 in adolescents. **Acta Dermatoven APA**, v.12, n.2, p.63-66, 2003.

WALBOOMERS, J.M.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH F.X.; KUMMER J.A.; SHAH K.V.; SNIJDERS P.J.F.; PETO J.; MEIJER C.J.L.M.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v.189, p.12-19, 1999.

WALLIN, K. L.; WIKLUND, F.; LUOSTARINEN, T.; ANGSTRÖM, T.; ANTILLA, 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 Cancer**, v.101, p.371-374, 2002.

WEINSTOCK H.; BERMAN, S.; JUNIOR, W.C. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. **Perspectives on Sexual and Reproductive Health**, v.36, n.1, p.6-10, 2004.

WINER, R.L.; KIVIAT, N.B.; HUGHES, J.P.; ADAM, D.E.; LEE, S.K.; KUYPERS, J.M.; KOUTSKY, L.A. Development and duration of human papillomavirus lesions after initial infection. **J Infect Dis**, v.191, p.731-738, 2005.

WHITE, A.E.; LIVANOS, E.M.; TLSTY, T.D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. **Genes Dev**, n.8, p.666-677, 1994.

WHO. World Health Organization. Human Papillomavirus. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index3.html>. Acesso em: 04 out 2010a.

WHO. World Health Organization. Sexually Transmitted Infections. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/index.html>>. Acesso em: 07 out 2010b.

WOLSCHICK, N.M.; CONSOLARO, M.E.L.; SUZUKI, L.E.; BOER, C.G. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. **RBAC**, v.39, n.2, p.123-129, 2007.

YUAN, Y. ZHANG, Y.X.; WATKINS, N.G.; CALDWELL, H.D. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. **Infect Immun**, v.57, p.1040-1049, 1989.

zur HAUSEN, H. Workshop on papillomaviruses and cancer. **Cancer Res**, v.39, p.545– 546, 1979.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Equipe Científica.

NOME	FORMAÇÃO	TÍTULO	ÓRGÃO	FUNÇÃO
Cristina Maria Borborema dos Santos	Farmacêutica Bioquímica	Doutor	UFAM	Orientadora
Júnia Raquel Dutra Ferreira	Farmacêutica Bioquímica	Mestre	UFAM	Co-Orientadora
Évelyn Costa Lira	Bióloga	Especial	UFAM	Pesquisadora
Mayara Rachel Silva Vilela	Graduanda em Farmácia		UFAM	Colaboradora
André Santos Silva	Ensino Médio		UFAM	Técnico do Laboratório de Diagnóstico Molecular

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos a Sra. para participar do Projeto de Pesquisa “Co-infecção do Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* e sua relação no Câncer de Colo do Útero”, que será realizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pretende verificar a presença do HPV e *C. trachomatis* em amostras cervicais de mulheres com e sem lesões no colo do útero, tendo como objetivo esclarecer a relação dos dois agentes em questão com estas lesões. A pesquisadora Évelyn Farias Costa, responsável pelo projeto, pede autorização para coletar (tirar) material do colo do seu útero para verificar se existe ou não a presença do HPV e *C. trachomatis*. O que não for usado será guardado e poderá ser usado em estudos futuros, não ultrapassando o tempo máximo de 5 anos. A coleta do material cervical será feita como se fosse a coleta do preventivo, por uma pessoa especializada, e pode causar certo desconforto, mas não há risco algum e será realizada com material descartável e novo. Além disso, a Sra. responderá a algumas perguntas relacionadas ao estudo, se for participar dele.

Se depois de autorizar a coleta, a Sra. não quiser que o material do colo do seu útero seja utilizado, tem o direito e a liberdade de falar que não quer que utilizemos seu material, seja antes ou depois da coleta, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. A Sra. não terá nenhuma despesa e o resultado do exame de HPV e *C. trachomatis* será encaminhado ao seu médico e anexado ao seu protocolo. A sua participação é importante para o melhor entendimento do que pode causar o câncer de colo do útero e de como este pode ser melhor diagnosticado.

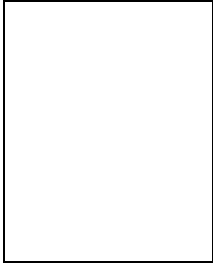
Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, ou seja, em nenhum momento seu nome será citado. Para qualquer outra informação, a Sra. poderá entrar em contato com a pesquisadora pelo telefone (92) 3647-4230 ou pelo e-mail: costa_eve@edu.com.br

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informada sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, entendi a explicação e autorizo a coleta da amostra e dos dados da entrevista. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

Assinatura da Participante

ou



Impressão do Polegar
caso não saiba assinar

Data

Pesquisadora Responsável

Data

APÊNDICE C – Questionário.

QUESTIONÁRIO

I. TRIAGEM

1. Informações sobre o estudo e confiabilidade do estudo

2. Consentimento da paciente em participar do estudo

2.1 () Sim

2.2 () Não

3. Identificação com as iniciais da paciente _____

4. Data de nascimento ____/____/____

5. Última menstruação ____/____/____

5.1 () não sabe informar

5.2 () menopausada

6. Qual a sua procedência? Nasceu:

Mora:

6.1 () Manaus

6.2 () Interior do estado do Amazonas

6.2 () Outro estado da região norte

6.3 () Outro estado da federação

7. Resultado do exame colpocitológico:

Data do exame: ____/____/____

7.1 () NIC I

7.7 () Normal

7.2 () NIC II

7.8 () Inflamatório*

7.3 () NIC III/Ca “in situ”

7.4 () Carcinoma microinvasor

7.5 () Carcinoma escamoso invasor

7.6 () Adenocarcinoma

*Inflamatório: () Específico

() Inespecífico

() *Candida* sp

() *T. vaginalis*

() Vaginose bacteriana

() Herpes

() *Chlamydia trachomatis*

() Cocos

() Outros: _____

- 21.1 () um
 - 21.2 () dois
 - 21.3 () três
 - 21.4 () quatro
 - 21.5 () cinco ou mais
22. Pesquisa para HIV:
- 22.1 () nunca fez exame
 - 22.2 () negativo
 - 22.3 () positivo

1. OBSERVAÇÕES:

2. RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO:

3. RESULTADO DA PCR:

ANEXOS

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0008.0.115.000-09, intitulado: “Co-infecção do Papilomavírus Humano (HPV) e Chlamydia trachomatis e sua relação no Câncer de Colo do Útero” tendo como Pesquisadora Responsável Evelyn Farias Costa.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 18 de março de 2009.

Prof. Dr. David Lopes Neto
Coordenador CEP/UFAM

ANEXO 2**Protocolo de Extração de DNA
Método FENOL:CLOROFÓRMIO (SAMBROOK et al., 1989)**

1. Adicionou-se 400 μ L de Fenol Hidratado a 400 μ L da amostra, que foi previamente digerida com proteinase K (BAUER; MANOS, 1998);
2. Homogeneizou-se suavemente durante 10 min. seguidos de 10 min. de centrifugação a 12.000 rpm;
3. Coletou-se o sobrenadante e, em seguida, adicionou-se 400 μ L de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1);
4. Homogeneizou-se essa mistura durante 10 min. e centrifugou-se a 12.000 rpm durante 10 min.;
5. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 μ L de Clorofórmio Hidratado 1:1;
6. Agitou-se durante 10 min. seguidos de centrifugação a 12.000 rpm durante mais 10 minutos;
7. O sobrenadante foi coletado novamente e foi adicionado 1/10 (10%) do volume do sobrenadante de NaCl 5M e 1000 μ L de Etanol Absoluto gelado;
8. O DNA foi precipitado à -20°C durante 12 horas.

NO DIA SEGUINTE

9. Centrifugou-se o material precipitado a 10.000 rpm durante 30 min.;
10. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente;
11. O sedimento de DNA (*Pellet*) foi lavado com 500 μ L de Etanol a 70% gelado;
12. Centrifugou-se a 8.000 rpm durante 10 min.;
13. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado;
14. O sedimento foi colocado para secar por, aproximadamente, 40 min. no fluxo laminar;
15. A ressuspensão do sedimento de DNA foi feita com 50 μ L de água Milli-Q.

ANEXO 3**Protocolo para Precipitação de DNA com Isopropanol/Etanol
(Applied Biosystems)**

1. Foram adicionados 80 μL de Isopropanol 75% em cada poço de uma placa contendo 96 poços (com reação de seqüenciamento de 20 μL);
2. A placa foi selada e deixada em temperatura ambiente durante 15 min.;
3. Em seguida, a placa foi centrifugada durante 30 min. a 4000 rpm em centrífuga refrigerada;
4. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente;
5. Foi aplicado um pulso na centrífuga com a placa invertida em papel absorvente;
6. Foram adicionados 200 μL de Etanol 70% em cada amostra e a placa foi selada, novamente;
7. Centrifugou-se durante 10 min. a 4000 rpm, em centrífuga refrigerada;
8. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente;
9. Os passos de 6 a 8 foram repetidos;
10. A placa foi acondicionada em termociclador a 60°C durante 5 a 8 min. para que o “*pellet*” secasse;
11. Em seguida, as amostras foram preparadas para o seqüenciador.

ANEXO 4**Protocolo para Preparo de Amostras para o Sequenciador**

1. Foram adicionados 10 μ L de Formamida Hi-Di em cada amostra;
2. A placa foi selada e vortexada, em seguida, aplicou-se um pulso na centrífuga;
3. As amostras foram desnaturadas em termociclador durante 2 min. a 95°C;
4. Em seguida, a placa foi imediatamente colocada no gelo durante 2 min.;
5. Foi aplicado um pulso na centrífuga para remoção de bolhas de ar;
6. O adesivo foi removido e a septa foi colocada na placa;
7. Em seguida, a placa com a bandeja e tampa adaptadora foram colocadas no “autosampler”.
8. As amostras com formamida foram corridas antes de completar 48 h para prevenir a degradação da fluorescência e da própria formamida.