

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**FREQUÊNCIA DE DOENÇAS SEXUALMENTE
TRANSMISSÍVEIS EM PACIENTES ASSINTOMÁTICAS E
ASSOCIAÇÃO COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

Luiza de Miranda Lima

**Belo Horizonte – Minas Gerais
2016**

LUIZA DE MIRANDA LIMA

**FREQUÊNCIA DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS
EM PACIENTES ASSINTOMÁTICAS E ASSOCIAÇÃO COM
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução Humana.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo de Melo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês de Miranda Lima.

**Belo Horizonte – Minas Gerais
Faculdade de Medicina - UFMG**

2016

A minha querida mãe,
exemplo de determinação, amor, dedicação e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, puderam compartilhar o esforço para a realização deste projeto, em especial:

Ao Prof. Dr. Victor Hugo de Melo, meu orientador, pela oportunidade deste trabalho, pela disponibilidade para avaliação e julgamento crítico dos dados e sabedoria na condução das dificuldades.

À Dr^a. Maria Inês de Miranda Lima, pelo incentivo e disponibilidade em ajudar na execução deste projeto.

A Dr^a. Danielle Zouli, que me convidou a participar deste trabalho, dando continuidade à sua linha de pesquisa, presença determinante para que tudo isso acontecesse.

À Dr^a. Renata Toscano, que viabilizou a pesquisa, disponibilizando o laboratório do Instituto de Ensino e Pesquisa para as análises, meu agradecimento.

À Dr^a. Claudia Loddi, pela disponibilidade e contribuição na análise estatística.

A todas as pacientes, razão primordial deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Introdução: as doenças sexualmente transmissíveis (DST) são consideradas um dos problemas de saúde pública mais comuns. Infecções como clamídia, neisseria, ureaplasma e micoplasma são, na grande maioria das vezes, assintomáticas e estão relacionados ao papilomavírus humano e à neoplasia intraepitelial cervical. O HPV de alto risco é fundamental para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e do câncer de colo uterino, porém, entre as mulheres infectadas por esse vírus de alto risco, somente algumas irão desenvolver NIC/câncer, sugerindo que outros cofatores são necessários para a persistência do HPV e alterações neoplásicas. **Objetivos:** conhecer a frequência de infecção genital por *human papillomavirus* (HPV), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e ureaplasma em mulheres de um ambulatório de Ginecologia geral e outro de propedêutica do colo uterino. E também: descrever a associação dessas infecções com NIC-2, identificar os fatores de risco para essas DSTs e NIC e estabelecer a necessidade de rastreamento dessas DSTs em pacientes de ambulatório de Ginecologia. **Pacientes e métodos:** estudo transversal com dois grupos, um de propedêutica do colo e outro de Ginecologia geral, realizado no período de 2014 a 2015. O grupo da propedêutica do colo constou de 71 pacientes e o grupo do ambulatório de Ginecologia geral de 55 pacientes. Todas elas, de ambos os grupos, foram submetidas à coleta de citologia cervical e amostra cervical para reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para HPV e as seguintes DSTs: clamídia, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, ureaplasma e neisseria. As pacientes da propedêutica do colo se submeteram a colposcopia e biopsia, quando indicado. Para a análise estatística usou-se o teste qui-quadrado para comparação das variáveis categóricas e os testes U-Mann-Whitney e qui-quadrado para avaliar se existiam associações, considerando o nível de significância de 0,05. A análise multivariada foi feita por regressão logística. **Resultados:** a frequência encontrada das DSTs foi: HPV: 46,8%; clamídia, 27,8%; *Mycoplasma genitalium*, 28,6%; *Mycoplasma hominis*, 0,8%; ureaplasma, 4,8%; neisseria, 4,8%. Os fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical foram: infecção por HPV ($p=0,024$), clamídia ($p=0,009$), *Mycoplasma genitalium* ($p=0,040$), coinfeção por HPV e clamídia ($p=0,023$) e infecção por HPV associada a pelo menos uma DST ($p=0,011$). Após análise multivariada, foi encontrada associação entre HPV e NIC ($p=0,040$ Odds ratio (OR);2,48, IC:1,04-5,92) e entre clamídia e NIC ($p=0,028$ OR:2,69 intervalo de confiança (IC):1,11-6,53). **Conclusões:** a frequência das DSTs (HPV, clamídia, neisseria, *Mycoplasma genitalium* e ureaplasma) foi alta em pacientes assintomáticas. Os fatores de risco para NIC foram: infecção por HPV, clamídia, *Mycoplasma genitalium*, coinfeção por HPV e clamídia e a infecção por HPV associada a pelo menos uma DST. A infecção por HPV e clamídia está associada à neoplasia intraepitelial cervical. A alta frequência das DSTs em mulheres assintomáticas reforça a necessidade de rastreamento rotineiro dessas infecções.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano. Clamídia tracomatis. Doenças Sexualmente Transmissíveis. Reação em Cadeia de Polimerase. Neoplasia Intraepitelial Cervical.

ABSTRACT

Introduction: Sexually transmitted diseases (STDs) are considered one of the most common public health problems. Infections such as chlamydia, Neisseria, ureaplasma and mycoplasma are in most cases asymptomatic, and are related to the presence of human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia. The high-risk HPV is critical to the development of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer, however, only some among infected women will develop CIN, suggesting that other cofactors are required for HPV persistence and neoplastic changes. **Objectives:** In order to determine the frequency of human papillomavirus (HPV), Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma infection in women examined in a general gynecology clinic and other in a colposcopy clinic. **Specific objectives:** 1-To study the association of these infections with CIN. 2- To evaluate risk factors for these STDs and NIC. 3- To assess the need to require STD exams as standard. **Patients and Methods:** A cross-sectional study was performed with a colposcopy clinic group and another from a general gynecology clinic in the 2014-2015 period. The colposcopy group consisted of 71 patients and the general gynecology group of 55 patients, all patients underwent cervical cytology and had cervical samples submitted to real-time PCR for detection of HPV and the following STDs; Chlamydia, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma and Neisseria. Colposcopy group patients were submitted to colposcopy and biopsy when indicated. For the statistical analysis, the chi-square test was used to determine whether there was a significant association between the variables, considering the 0.05 significance level. Multivariate analysis was performed by logistic regression. **Results:** The prevalence of STDs was: HPV: 46.8%, Chlamydia: 27.8%, Mycoplasma genitalium: 28.6%, Mycoplasma hominis: 0.8%, Ureaplasma: 4.8%, Neisseria 4.8%. The risk factors for cervical intraepithelial neoplasia were HPV infection ($p = 0.024$), chlamydia ($p = 0.009$), Mycoplasma genitalium ($p = 0.040$), co-infection with HPV and chlamydia ($p = 0.023$) and HPV infection associated to the presence of at least one STD ($p = 0.011$). After multivariate analysis we found positive association between HPV and CIN ($p = 0.040$ OR , 2.48 ; CI: 1.04 to 5.92) and between Chlamydia and NIC ($p = 0.028$ OR: 2.69 CI: 1,11 6.53) . **Conclusions:** Frequency of STDs (HPV, Chlamydia, Neisseria, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma) was high in asymptomatic patients. Risk factors for CIN were HPV infection, chlamydia, mycoplasma genitalium, co-infection with HPV and chlamydia and HPV infection associated with the presence of at least one DST. HPV and Chlamydia infections are independently associated with the presence of cervical neoplasia. High frequency of STD in asymptomatic women confirms the need for routine screening of these infections.

Keywords: Human papillomavirus. Chlamydia trachomatis. Sexually transmitted diseases. Polymerase chain Reaction. Cervical intraepithelial neoplasia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do genoma do HPV.....	19
FIGURA 2 - Integração do genoma viral.....	22
FIGURA 3 - Evolução das NICs para câncer invasor.....	23
FIGURA 4 - Lâmina citológica de <i>Chlamydia trachomatis</i>	29
FIGURA 5 - Micrografia eletrônica de amostra clínica de derivado de célula vaginal marcado e embebida em resina LR branca de epóxi.....	41
FIGURA 6 - Tamanho e morfologia celular de ureaplasma.....	44
FIGURA 7 - Eletroforese em gel poliacrilamida 10% dos amplicons da PCR para detecção do HPV.....	56
FIGURA 8 - PCR multiplex em tempo real para as DSTs.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Frequência das DSTs (n=126).....	64
--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Funções das proteínas do vírus HPV.....	22
QUADRO 2 - Características das categorias citológicas pelo Sistema Bethesda III.....	26
QUADRO 3 - <i>Primers</i> utilizados na detecção de HPV.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características epidemiológicas das pacientes de acordo com os grupos: ambulatório geral (grupo 1) e propedêutica do colo (grupo 2)....	62
TABELA 2 - Características das pacientes atendidas no ambulatório de patologia do colo.....	62
TABELA 3 - Características epidemiológicas das pacientes com e sem neoplasia intraepitelial cervical.....	63
TABELA 4 - Frequência das DSTs nos dois grupos: ambulatório geral (grupo 1) e propedêutica do colo (grupo 2).....	65
TABELA 5 - Frequência das pacientes com DSTs em relação à ocorrência de neoplasia intraepitelial cervical.....	66
TABELA 6 - Frequência das DSTs associadas ao HPV em relação à ocorrência de neoplasia intraepitelial cervical.....	66
TABELA 7 - Variáveis selecionadas para a análise multivariada.....	67
TABELA 8 - Modelo final da análise multivariada por regressão logística para a variável resposta NIC.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC-H	Células escamosas atípicas de significado indeterminado – provável neoplasia
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado – provável reacional
ATP	Trifosfato de adenosina
BMB	Banco de Material Biológico
CCU	Carcinoma cervical uterino
CDC	<i>Center of Diseases Control and Prevention</i>
CEP/SCBH	Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte
CNDST-AIDS	Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Clamídia tracomatis
DIP	Doença infecciosa pélvica
DIU	Dispositivo intrauterino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxiribonucleotídeos trifosfatos
DST	Doença sexualmente transmissível
E	<i>Early</i>
EB	Corpo elementar
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
IARC	Agência Nacional de Pesquisa em Câncer
IC	Intervalo de confiança

IEP	Instituto de Ensino e Pesquisa
IFCPC	<i>International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
Kpb	1.000 pares de base
L	<i>Late</i>
LCR	Reação em cadeia da ligase
LPS	Lipossacarídeos
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
MBA	<i>Multiple-banded antigen</i>
MHC	Moléculas de histocompatibilidade
MIF	Testes de microimunofluorescência
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mol%	<i>Mole percent</i>
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
NAATS	Testes de amplificação de ácidos nucleicos
NAD-H	Nucleotídeo de nicotinamida e adenina
NCSSG	<i>National Chlamydia Screening Steering Group</i>
NH ₃	Amônia
NIC I	Neoplasia cervical grau I
NIC III	Neoplasia cervical grau III
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC II	Neoplasia cervical grau II
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pRb	Retinoblastoma
RDR	Ribonucleosídeo difosfato redutase
RNA	Ácido ribonucleico

rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCC	Carcinoma de células escamosas
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	<i>Transcription-mediated amplification</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNG	Uretrite não gonocócica
VB	Vaginose bacteriana
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Papilomavírus humano.....	19
2.2 Neoplasia intraepitelial cervical.....	23
2.2.1 Diagnóstico das lesões precursoras e do câncer do colo do útero.....	25
2.2.1.1 Citologia oncótica.....	25
2.2.1.2 Colposcopia.....	27
2.2.1.3 Biologia molecular.....	27
2.3 Clamídia.....	28
2.3.1 Aspectos biológicos.....	28
2.3.2 Aspectos clínicos.....	30
2.3.3 Vias de transmissão.....	31
2.3.4 Diagnóstico da infecção por clamídia trachomatis.....	31
2.3.4.1 Cultivo celular.....	32
2.3.4.2 Pesquisa direta de antígenos.....	32
2.3.4.3 Pesquisa de anticorpos específicos.....	33
2.3.5 Diagnóstico molecular de clamídia trachomatis.....	33
2.3.5.1 Hibridização de ácidos nucleicos.....	34
2.3.5.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	34
2.3.5.3 Captura híbrida (HC).....	36
2.4 Associação entre clamídia e HPV.....	36
2.5 <i>Mollicutes</i>	38
2.5.1 <i>Mycoplasma genitalium</i>	39
2.5.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	41
2.5.3 <i>Ureaplasma urealyticum</i>	43
2.6 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	46

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2014.

3 JUSTIFICATIVA	50
4 OBJETIVOS.....	51
4.1 Objetivo geral.....	51
4.2 Objetivos específicos.....	51
5 PACIENTES E MÉTODOS.....	52
5.1 Aspectos éticos.....	52
5.2 Seleção de pacientes.....	52
5.2.1 Local e período das coletas.....	52
5.2.2 Critérios de inclusão.....	52
5.2.3 Critérios de exclusão.....	53
5.2.4 Abordagem das pacientes.....	53
5.2.5 Amostras obtidas.....	54
5.2.6 Grupos analisados.....	54
5.2.7 Coleta de material para citologia.....	54
5.2.8 Colposcopia.....	54
5.2.9 Biópsia.....	55
5.2.10 Extração de DNA.....	55
5.2.11 Detecção de HPV.....	55
5.2.12 PCR para DSTs.....	57
5.3 Análise estatística.....	59
5.3.1 Análise descritiva dos grupos.....	59
5.3.2 Análise univariada.....	59
5.3.3 Análise multivariada.....	60
6 RESULTADOS.....	61
7 DISCUSSÃO.....	68
7.1 Teste de biologia molecular para HPV e DST.....	79
7.2 Frequência de DSTs.....	70
7.3 Associação das DSTs com NIC.....	74
8 COMENTÁRIOS FINAIS.....	79
9 CONCLUSÕES.....	80

REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICES E ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são consideradas um dos problemas de saúde pública mais comuns. A relevância dessas doenças é evidenciada pela repercussão de suas sequelas, como infertilidade, relação com aumento da morbidade e da mortalidade materna e infantil, além do papel facilitador da transmissão sexual do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Entre os tipos, estão: gonorreia (*Neisseria gonorrhoeae*), uretrite por clamídia, sífilis (*Treponema pallidum*); uretrite não gonocócica e não clamídia e as chamadas *mollicutes* (micoplasma e ureaplasma) (VERTERAMO *et al.*, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram 340 milhões de novos casos de DSTs por ano em pessoas de 15 a 49 anos, dos quais 10 a 12 milhões somente no Brasil (BRASIL, 2008).

Infecções como clamidia, neisseria, ureaplasma e micoplasma são, na grande maioria das vezes, assintomáticas e podem estar também relacionadas ao papilomavírus humano e à neoplasia intraepitelial cervical (KHARSANY *et al.*, 1993).

O papilomavírus humano (HPV) é considerado a doença sexualmente transmissível mais frequente no mundo. O papilomavírus humano possui mais de 100 subtipos e, entre estes, cerca de 40 infectam o trato genital inferior, sendo que alguns tipos mais oncogênicos se integram ao ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula, causando as alterações pré-malignas e iniciando o processo da carcinogênese (AIDÉ *et al.*, 2009).

O HPV de alto risco é fundamental para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical e do câncer de colo uterino, porém, entre as mulheres infectadas com HPV de alto risco, somente algumas irão desenvolver neoplasia intraepitelial cervical (NIC)/câncer, sugerindo que outros cofatores são

necessários para a persistência do HPV e a ocorrência de alterações neoplásicas (AIDÉ *et al.*, 2009).

Apesar de a clamídia tracomatis (CT) ser o agente infeccioso descrito com mais evidência de associação com o HPV, devido à resposta inflamatória gerada no colo do útero e pelos danos genotóxicos causados, a associação com outros agentes sexualmente transmissíveis acaba dificultando o estabelecimento de uma relação causal fidedigna. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), os danos genotóxicos associados à resposta inflamatória local é um mecanismo provável de interação entre o HPV e outros agentes infecciosos que justificam, em parte, a persistência e progressão da doença. Nesse contexto incluem-se espécies de micoplasmas, os quais têm sido descritos como principais causadores de diversos distúrbios genitais, tais como as uretrites não gonocócicas e não clamidiais e em casos de vaginose bacteriana (VB). Tais microrganismos são capazes de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL)1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas. O recrutamento de células da resposta imune para o local da infecção causa intensa inflamação. Essa resposta tem sido associada a um possível fator de risco para desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (JENSEN, 2011).

A associação de fatores a uma determinada doença quase sempre requer mais evidências, e o câncer cervical é um tema que necessita de mais esclarecimentos quanto ao seu desenvolvimento. Dessa forma, espera-se que o estudo das DSTs identificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex em amostras cervicais de pacientes assintomáticas para cinco agentes sexualmente transmissíveis: clamídia, neisseria, *Mycoplasma genitalium* e *hominis* e a pesquisa do HPV nessas pacientes possa contribuir para avaliar a necessidade de rastreamento das DSTs e para verificar a associação dessas infecções com a neoplasia intraepitelial cervical.

2 REVISÃO DA LITERATURA

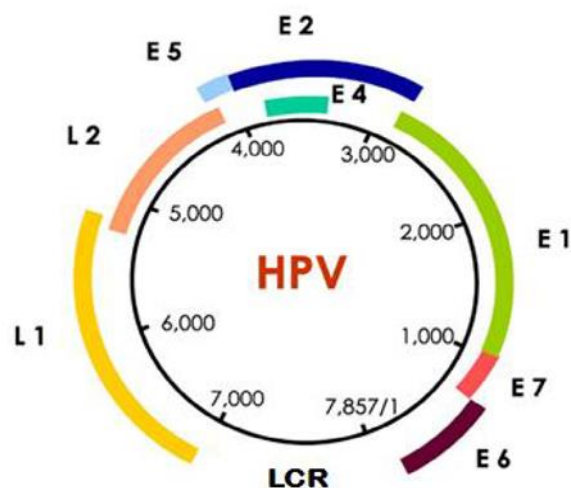
2.1 Papilomavírus humano

A infecção pelo HPV é a DST mais frequente no mundo. Estimam-se aproximadamente 500.000 a 1 milhão de casos novos por ano. A estimativa de prevalência das infecções entre mulheres varia de 2 a 44%, devido a diferentes faixas etárias, comportamento sexual diversificado entre as populações e pela sensibilidade dos métodos de diagnóstico (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

O HPV é um vírus envelopado, icosaédrico, com capsídeo de 72 capsômeros e DNA dupla-fita com 8.000 pares de bases (BOSCH; SANJOSE, 2003).

Pertence à família *Papillomaviridae*, gênero papilomavírus. Seu DNA é formado por oito pares de genes, seis de expressão precoce (E = *early*), numerados de um a seis; e dois de expressão tardia (L = *late*), numerados como um e dois. Cerca de 150 tipos de HPV já foram identificados, sendo que 40 deles infectam o trato genital feminino (BOSCH *et al.*, 2003). (Figura 1)

FIGURA 1- Representação esquemática do genoma do HPV



Fonte: Muñoz *et al.* (2006).

Os vírus com predileção pelo trato genital feminino podem ser classificados como de alto e baixo risco, de acordo com sua capacidade de levar as células infectadas até estágios de transformações neoplásicas.

Assim, são divididos em:

Baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81

Alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (MUNÓZ *et al.*, 2003).

Os vírus de alto risco são frequentemente associados às neoplasias cervicais de alto grau (NIC II e NIC III) e os de baixo risco estão ligados às neoplasias de baixo grau (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2003).

Após penetrar no colo do útero através de microtraumas no epitélio, o HPV se liga nas células da camada basal por receptores específicos e insere seu material genético no citoplasma do hospedeiro. Nesse momento começa a formação de diversos caminhos que definirão o futuro dessa infecção, podendo haver eliminação completa do vírus, formação de lesão de baixo grau, lesão de alto grau e carcinoma invasor.

A maioria dos vírus é eliminada pelas defesas naturais do organismo, tanto a imunidade inata como a adquirida. Os vírus de baixo risco mantêm seu DNA na forma circular, episossomal, sem integração ao DNA do hospedeiro e com seu gene de regulação (E2) intacto. Os outros genes formarão as novas partículas virais que manterão o ciclo de vida e de infecção do vírus (BASEMAN; KOUTSKY, 2005).

Os vírus de alto risco têm a capacidade de mais efetivamente se protegerem das defesas do hospedeiro, persistindo dentro das células e, assim, conseguem integrar seu DNA, saindo da forma circular e episossomal para a forma linear e ligada ao DNA hospedeiro. (Figura 2)

A região precoce, constituída pelos genes E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, é responsável pela replicação viral, transcrição e transformação celular. Os genes E1 e E2 são importantes para que ocorra a replicação, sendo que E1 possui

atividade DNA helicase, enquanto E2 regula a transcrição gênica de E6 e E7 do vírus. O gene E3 não é encontrado nos HPVs. O gene E4, expresso nos estágios tardios, provoca alteração da matriz intracelular, levando à formação dos coilócitos, maturação do vírus com consequente liberação de novas partículas do vírus. Os genes E5, E6 e E7 estão associados à proliferação e transformação celular, sendo que as oncoproteínas E6 e E7 levam à imortalização da célula infectada (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005). (Quadro 1)

As proteínas p53 e pRb são supressoras tumorais responsáveis pela regulação do ciclo celular, atuando, respectivamente, no reparo do DNA, indução da apoptose e no controle da proliferação celular (passagem da fase G1 para S) (KUMAR *et al.*, 2010).

O processo de malignização celular provocado por E6 e E7 atua principalmente nessas duas proteínas e levam à imortalização celular. A oncoproteína E6 leva à degradação, por proteólise, da proteína P53 e com isso acontece acúmulo de erros no DNA da célula infectada, levando a: instabilidade cromossômica, ausência de apoptose e proliferação celular anormal. O E7 inibe a atividade da proteína pRb (retinoblastoma), induzindo à proliferação celular exacerbada (GANGULY; PARIHAR, 2009).

A expressão oncogênica desencadeia alterações no DNA hospedeiro, que resultam em crescimento celular desordenado, com evolução das células para estágios pré-neoplásicos. Essas alterações, em condições normais, seriam facilmente detectadas e eliminadas pelos sistemas de vigilância do genoma, principalmente as proteínas expressas pelos genes p53 e Rb (retinoblastoma).

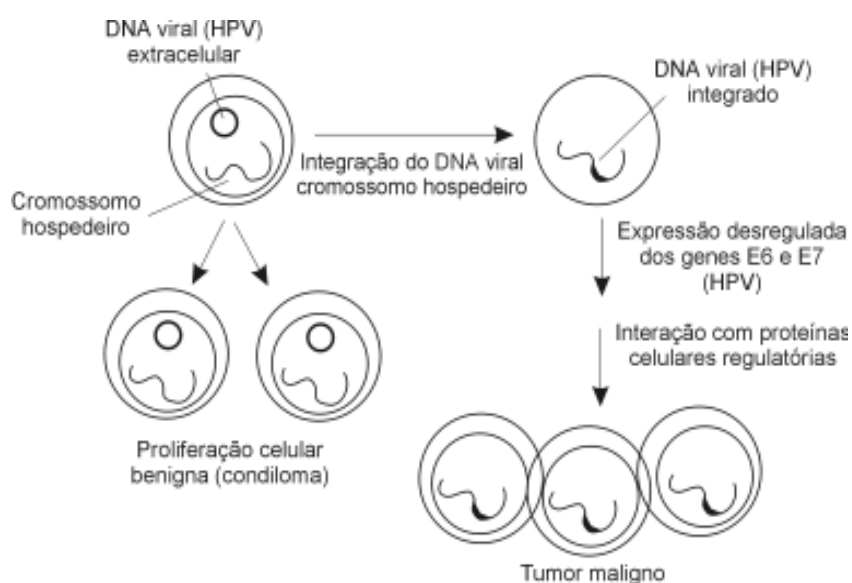
Sucintamente, pode-se dizer que a proteína p53 tem a função de reparar danos do DNA e levar a célula à apoptose. Se esse dano for irreparável, a proteína pRb interrompe o ciclo celular no ponto de checagem G1 se houver algum erro na transcrição na fase G1 do ciclo, parando indefinidamente a progressão. Essas funções deixam de ser executadas porque sofrem ação dos oncogenes virais.

QUADRO 1- Funções das proteínas do vírus HPV

Proteína Viral	Função
E1	Replicação viral
E2	Replicação viral e regulação da transcrição de E6 e E7
E3	Não está presente nos papilomas vírus humanos
E4	Desestabilização de citoqueratinas
E5	Atividade mitogênica por interação com fatores de crescimento
E6	Oncoproteína. Inibe a ação da p53
E7	Oncoproteína. Inibe a ação da pRB
L1	Proteína maior do capsídeo
L2	Proteína menor do capsídeo

Fonte: adaptado de Ghittoni *et al.* (2010).

FIGURA 2 – Integração do genoma viral

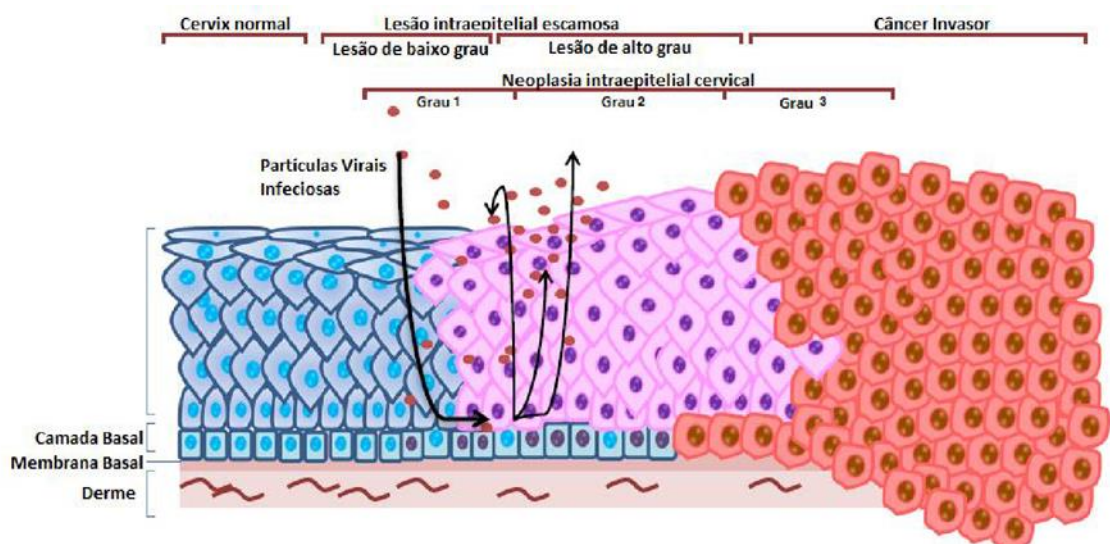


Fonte: adaptado de Saavedra, Brebi e Roa (2012).

2.2 Neoplasia intraepitelial cervical

As lesões precursoras do carcinoma cervical uterino (CCU) são chamadas de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e são lesões do epitélio escamoso ou glandular, que apresentam células com vários graus de atipias, capazes de alterar a estrutura do epitélio sem o rompimento da membrana basal. As NICs podem ser divididas em graus I, II e III, que têm como base de classificação o nível de perda da diferenciação das três camadas do epitélio do colo uterino (DOORBAR, 2005; MORTOZA JÚNIOR, 2006). Nas lesões NIC I, ou de baixo grau, as células indiferenciadas ocupam apenas o terço basal do epitélio. Na NIC II, que junto com a NIC III é considerada lesão de alto grau, as células perdem a capacidade de maturação até o nível da camada intermediária e a indiferenciação do epitélio ocupa os dois terços internos da espessura epitelial. Na NIC III o epitélio perde sua capacidade total de diferenciação e toda a espessura do epitélio é comprometida (AIDÉ *et al.*, 2009; MORTOZA JÚNIOR, 2006). A NIC III inclui o termo displasia acentuada ou carcinoma de células escamosas *in situ*. Essas lesões devem ser tratadas a tempo para impedir que evoluam para o câncer de colo uterino (MORTOZA JÚNIOR, 2006). (Figura 3)

FIGURA 3 – Evolução das NICs para câncer invasor



Fonte: adaptado de Saavedra, Brebi e Roa (2012).

Analisando a evolução das NICs, Ostör *et al.* (1993) constataram que as verdadeiras lesões precursoras do CCU são as NICs de alto grau, pois a taxa de progressão vai de 1,5% nas NIC II acerca de 12% nas NICs III. A taxa de regressão da NIC I é alta, chegando a 57% (OSTÖR *et al.*, 1993).

A persistência do HPV é uma causa imprescindível para dar origem ao câncer de colo do útero. A literatura relata o DNA do HPV em 99,7% dos casos de CCU (WALBOOMERS *et al.*, 1999), podendo a infecção ser por um ou vários tipos virais que podem agir em conjunto no surgimento ou progressão tumoral (TROTTIER *et al.*, 2006).

A infecção pelo HPV pode apresentar três formas de evolução: a) o vírus infecta o indivíduo, mas é eliminado pelo sistema imunológico (90% dos casos) (TROTTIER *et al.*, 2006); b) após a infecção o HPV entra em estado de latência, ou seja, não há a manifestação dos sintomas clínicos ou subclínicos. Neste caso, o DNA viral pode ser detectado nas células do paciente por técnicas de biologia molecular; c) ocorre a infecção aguda com o aparecimento da doença (condilomas, NICs), que pode evoluir para a infecção crônica devido à persistência viral, principalmente das cepas oncogênicas. É nesse pequeno grupo de portadores crônicos que pode se dar a progressão da lesão e formação do câncer do colo do útero (SCHLECHT *et al.*, 2003).

Os fatores de risco para persistência do HPV oncogênico são:

- a) Fatores comportamentais: tabagismo, uso de hormônios exógenos, início precoce da vida sexual, múltiplos parceiros, mau uso da camisinha;
- b) Fatores relacionados ao hospedeiro: idade, imunidade (infecção pelo HIV), predisposição genética, dieta;
- c) Fatores relacionados ao próprio HPV: cepa viral, carga e integração do vírus ao genoma da célula (FEHRMANN; LAIMINS, 2003).

Diversos estudos registram a clamídia e outras DSTs como fatores de persistência do HPV, considerando a alteração da imunidade local em decorrência do processo inflamatório crônico.

Smith *et al.* (2004), com o objetivo de determinar se a infecção por clamídia *tracomatis* é consistentemente associada ao aumento do risco de carcinoma invasivo, realizaram estudo do tipo caso-controle com 1.238 casos de carcinoma invasivo e 1.100 controles, dosando anticorpos anticlamídia *tracomatis* presentes no soro. Os resultados revelaram que o risco de desenvolver carcinoma escamoso invasivo foi maior em mulheres com títulos de anticorpos anticlamídia *tracomatis*. Barros *et al.* (2012), avaliando a associação de HPV e clamídia em 131 pacientes brasileiras com câncer de colo uterino, encontraram 31 casos (27,4%) de coinfeção por clamídia e HPV.

2.2.1 Diagnóstico das lesões precursoras e do câncer do colo do útero

O diagnóstico do CCU baseia-se nos exames de citologia oncótica, colposcopia, biópsia e biologia molecular.

2.2.1.1 Citologia oncótica

O exame ainda mais adotado no rastreamento do câncer do colo do útero é a citologia oncótica (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2010). No Brasil é recomendado iniciar esse rastreamento nas mulheres com 25 a 64 anos de idade, após iniciarem a vida sexual, com intervalos a cada três anos após já terem feito dois exames anuais negativos e interrompendo aos 64 anos, quando apresentarem, nos últimos cinco anos, dois exames consecutivos negativos (BRASIL, 2011).

O método apresenta limitações com resultados falso-negativos variando entre 15 e 50% e os falso-positivos em torno de 10% dos casos, com sensibilidade

variando de 50 a 90% e especificidade de 70 a 90% dos exames (*CENTER OF DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2004*).

A nomenclatura adotada no Brasil é baseada no Sistema Bethesda III, que divide os resultados em quatro categorias: a) células escamosas atípicas (ASC) - células escamosas atípicas de significado indeterminado provável reacional (ASC-US) e células escamosas atípicas de significado indeterminado provável neoplasia (ASC-H); b) lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL); c) lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); d) carcinoma de células escamosas (SCC) (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). (Quadro 2)

QUADRO 2 - Características das categorias citológicas pelo Sistema Bethesda III

Categoria	Sigla	Característica citológica
Células escamosas atípicas de significado indeterminado - provável reacional	ASC-US	Atipias reacionais. Aumento nuclear duas a três vezes o núcleo da célula intermediária, leve hiper cromasia, leve variação do tamanho e forma nuclear e com irregularidade mínima de sua membrana
Células escamosas atípicas de significado indeterminado - provável neoplasia	ASC-H	Alterações um pouco mais intensas que na ASC-US
Lesão intraepitelial de baixo grau	LSIL	Coilocitose (células do porte das intermediárias ou superficiais com núcleos atípicos, halo perinuclear extenso e com bordas espessadas)
Lesão intraepitelial de alto grau	HSIL	Células profundas com cromatina grosseira e desprovida de citoplasma, discarióticas e em fila indiana
Carcinoma de células escamosas	SCC	Células com cromatina grosseira, espaços vazios, nucléolos múltiplos e irregulares. Células de formato anômalo (células em girino)

Fonte: adaptado de Lira Neto (*apud* MORTOZA JÚNIOR, 2006).

O diagnóstico histopatológico não identifica o HPV e sim as alterações teciduais causadas pelo vírus, como hiperplasia, coilocitose, disceratose, paraceratose e atipias nucleares (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). A nomenclatura utilizada para este é a de Brasil, baseada em Richart (1973 *apud* Wright, Kurman e Ferenczy,

2002, 0; 256): NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma invasor (BRASIL, 2011) (ANEXO B).

2.2.1.2 Colposcopia

A colposcopia é um exame ambulatorial que analisa o colo do útero com a utilização de um microscópio binocular chamado colposcópico, com a capacidade de amplificar a imagem quatro a 40 vezes o tamanho real. A colposcopia é utilizada como método complementar nas pacientes com citologia alterada, com a finalidade de guiar o local mais alterado para a realização da biópsia (RAMA *et al.*, 2008).

Esse exame, associado à citologia, apresenta alta sensibilidade, de 98% (TUON *et al.*, 2002). A terminologia colposcópica atual recomendada é a nomenclatura da *International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy* (IFCPC 2011), aceita no Congresso Mundial do Rio de Janeiro em 05 de julho de 2011 (ANEXO A).

2.2.1.3 Biologia molecular

A biologia molecular é utilizada com a finalidade de identificar e tipificar o HPV nas células infectadas (MOLIJN *et al.*, 2005). Compreende várias técnicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) tradicional e em tempo real (RT-PCR), hibridização *in situ* e captura híbrida. A detecção pela PCR é considerada a mais sensível no caso do HPV, pois mesmo em quantidades pequenas de DNA é possível identificar o vírus (BIGIO; BARBOSA; CAVALCANTI, 2002; MOLIJN *et al.*, 2005), sendo a técnica mais utilizada na pesquisa científica. A captura híbrida é feita com um coquetel de sondas do grupo de baixo risco (grupo A) e um de alto risco (grupo B), que consiste na hibridização de DNA, sendo o método molecular mais utilizado para a detecção do HPV (FEHRMANN; LAIMINS, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009).

2.3 Clamídia

2.3.1 Aspectos biológicos

Historicamente, todas as clamídias foram classificadas em uma única ordem, as *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, dentro de um único gênero, *Chlamydia*, e quatro espécies conhecidas: *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*. Todas as espécies, exceto *Chlamydia pecorum*, estão associadas a doenças em seres humanos (SMITH *et al.*, 2002).

As clamídias sobrevivem replicando-se unicamente dentro de um vacúolo especializado de células eucarióticas denominadas inclusões citoplasmáticas. Possuem restrições metabólicas e são incapazes de sintetizar trifosfato de adenosina (ATP), necessitando, desse modo, de fonte externa de energia. A replicação apresenta ciclo multimórfico e sem sincronismo. Por apresentar ciclo biológico intracelular obrigatório, o gênero *Chlamydia* foi considerado inicialmente um vírus (SCHACHTER; STAMM, 1999). Diferentemente dos vírus, possui ácido ribonucleico (RNA), DNA e ribossomo típico de organismos procariotos. Por outro lado, apresenta duas unidades gênicas controladas por sequências regulatórias comuns (operons), o que torna a clamídia *trachomatis* diferente dos demais procariotos. Elas exibem similaridades morfológicas e estruturais com uma bactéria Gram-negativa, incluindo uma membrana trilaminar que contém lipossacarídeos e diversas proteínas de membranas que são estrutural e funcionalmente análogas à estrutura da *Escherichia coli*. (Figura 4)

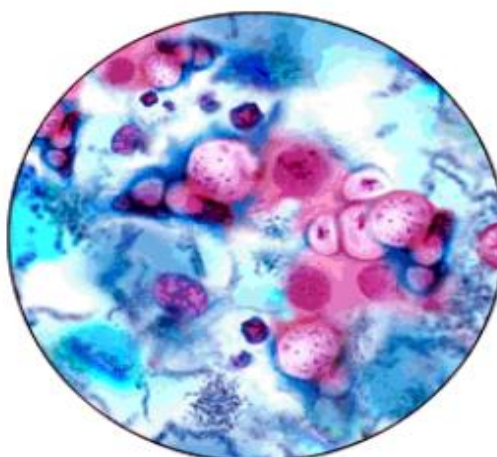
O genoma da clamídia *trachomatis* é formado por um cromossomo circular, com 1.042.519 bp (58,7% de A-T) e um plasmídio com 7493 pb (número de acesso no *Gen Bank* AE001273). O genoma é extremamente pequeno e completo e contém ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S (THOMAS *et al.*, 1997). O genoma da clamídia codifica aproximadamente 875 proteínas, das quais 70 são exclusivas da espécie *Chlamydia trachomatis*. Até o momento foram sequenciados os genomas dos sorotipos D, B e L2 de clamídia *trachomatis* (STEPHENS *et al.*, 1998).

Todos os plasmídios de isolados de clamídia *trachomatis*, por sua vez, são extremamente conservados, com menos de 1,0% de variação na sequência

nucleotídica (THOMAS *et al.*, 1997). Isolados clínicos de clamídia tracomatis que não apresentam plasmídeo, embora raros, já foram caracterizados (FARENCENA *et al.*, 1997, MIYASHITA *et al.*, 2001). Observou-se que o padrão de suscetibilidade a antibióticos por linhagens de clamídia tracomatis com e sem plasmídeo não difere, o que demonstra que este não contribui na transferência de resistência. Por outro lado, linhagens de clamídia tracomatis que não apresentam plasmídeo diferenciam-se das demais pela morfologia não usual das inclusões e pela ausência de glicogênio (MIYASHITA *et al.*, 2001).

A clamídia tracomatis tem sido estudada extensivamente devido à sua associação com tracoma ocular e sua importância como patógeno sexualmente transmissível. Tendo complexa antigenicidade, são poucos os antígenos importantes para o diagnóstico e patogênese da infecção: os antígenos lipossacarídeos (LPS), constituídos principalmente de ácido cetodeoxietanoico, e o antígeno da *major outer membrane protein* (MOMP), que são utilizados para a sorotipagem de espécie e subespécie (caracterização realizada com base em painel de anticorpos monoclonais) (STAMM; JONES; BATTEIGER, 2005).

FIGURA 4 - Lâmina citológica de *Chlamydia trachomatis*



Fonte: http://www.drclarlos.med.br/artigo_044.html.

2.3.2 Aspectos clínicos

A infecção por clamídia *tracomatis* é a doença sexualmente transmissível bacteriana mais comum (MANHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003).

Os sorotipos A, B, Ba e C são associados ao tracoma endêmico, que já foi a causa mais comum de cegueira, cuja prevenção é possível. Já os sorotipos L1, L2 e L3 estão associados ao linfogranuloma venéreo. Os sorotipos D a K são os responsáveis pela uretrite não gonocócica e epididimite em homens e podem induzir a síndrome de Reiter, proctite e conjuntivite, tanto em mulheres quanto em homens. Em mulheres, esses sorotipos causam cervicite, uretrite, endometrite, salpingite e peri-hepatite (STAMM; JONES; BATTEIGER, 2005).

O maior impacto da infecção se dá no aparelho reprodutor feminino. Embora a maior parte das infecções causadas por clamídia *tracomatis* em mulheres seja assintomática, podem ocorrer manifestações como cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP) e abscessos na glândula de Bartholin. Quando sintomática, observam-se corrimento vaginal, disúria, sangramento e dor após as relações sexuais (WARFORD; CHERNESKY; PETERSON, 2003). O sítio inicial da infecção é usualmente a endocérvix, mas pode acometer uretra e reto. Infecções somente na uretra são menos comuns, 5,0 a 30,0%; na endocérvix e uretra, 50,0 a 60,0% (VILLA, 1997). A ascensão do microrganismo do trato geniturinário baixo para endométrio e tubas uterinas pode ser a causa de dor no baixo ventre e anormalidades menstruais. A DIP resulta de infecção ascendente e é responsável pela morbidade da infecção.

O paradoxo em relação a essa infecção é que, mesmo assintomática, pode causar grave lesão tubária. A salpingite latente e não tratada é a maior causa de infertilidade. Diversos estudos associam a infecção tanto sintomática quanto assintomática à gravidez ectópica (ASHSHI *et al.*, 2015).

2.3.3 Vias de transmissão

Os fatores de risco para adquirir a infecção são diversos, destacando-se mulheres com menos de 20 anos, separadas e sem filhos; uso de contraceptivos orais, raça negra, classe socioeconômica desfavorecida e o comportamento de risco como a promiscuidade e o não uso de preservativos. O impacto maior da infecção por clamídia ocorre no sistema reprodutivo feminino. Aproximadamente, 65,0% dos recém-nascidos de mães infectadas contraem a infecção quando o parto é natural. O tratamento de pacientes infectados previne a transmissão ao parceiro sexual e a transmissão da gestante ao recém-nascido durante o trabalho de parto. A clamídia *tracomatis* pode ser transmitida ao feto durante o parto vaginal, resultando em pneumonia neonatal. Infecções vaginais, faringiais e entéricas também já foram relatadas em neonatos (MANHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003).

2.3.4 Diagnóstico da infecção por clamídia *tracomatis*

A detecção da infecção por clamídia *tracomatis* ainda é um desafio, pois a frequência de infecções assintomáticas é alta. Mesmo os casos sintomáticos podem não ser reconhecidos e confirmados exclusivamente por critérios clínicos, devido à semelhança dos sintomas com outras DSTs. A clamídia pode ser detectada a partir de cultivo celular, imunofluorescência direta, enzima imunoensaio (Ag/Ac), imunofluorescência indireta (pesquisa anticorpo), hibridização com sonda de DNA e amplificação do DNA/RNA - *nucleic acids amplification tests* (NAAT).

Os testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção urogenital causada por clamídia *tracomatis*, tradicionalmente, empregam *swabs* endocervicais ou uretrais para a obtenção da amostra. Os testes de detecção de ácidos nucleicos têm adquirido importância, por utilizar também amostras de urina, especialmente quando se quer identificar pessoas assintomáticas. Em qualquer método que se utilize, a coleta adequada é essencial e relaciona-se diretamente à sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico. A RT-PCR apresenta sensibilidade de

97,1% e especificidade de 98,1%, sendo muito raros os falso-positivos (CDC, 2002).

2.3.4.1 Cultivo celular

Durante muitos anos, a cultura bacteriológica foi considerada “padrão-ouro” no diagnóstico de clamídia tracomatis. Porém, o advento das técnicas moleculares e as limitações como a labilidade dessa infecção nas amostras clínicas e variações de *performance* interlaboratorial do cultivo levaram a repensar essa condição (BLACK, 1997).

A cultura é realizada pela inoculação de cada linhagem celular (células McCoy, BGMK e HeLa 299) distribuídas em monocamada sobre microplacas e um meio que favorece o crescimento das células. Se existirem corpúsculos elementares na amostra, estes infectam as células e crescem, originando inclusões intracitoplasmáticas em 48 a 72 horas, as quais contêm elevado número de corpúsculos elementares e reticulares, podendo ser visibilizados por imunofluorescência com a ajuda de anticorpos monoclonais fluorescentes antiMOMP ou antiLPS. Essas inclusões podem ser visibilizadas também com coloração de Giemsa ou iodo (BÉBÉAR; BARBEYRAC, 2009).

2.3.4.2 Pesquisa direta de antígenos

A visibilização direta do antígeno da clamídia pode ser realizada utilizando-se corante à base de iodo, Giemsa e imunofluorescência direta (IFD).

A IFD é o único teste que avalia simultaneamente a adequação da amostra (pelo menos uma célula colunar epitelial) e a existência dos antígenos MOMP e LPS, utilizando anticorpos monoclonais fluorescentes. Tem sensibilidade que varia entre 80,0 e 90,0% e especificidade de 98,0 a 99,0% em relação à cultura quando ambas são realizadas em condições ótimas. A desvantagem do método é a necessidade de pessoal treinado adequadamente para preparar e interpretar os resultados.

2.3.4.3 Pesquisa de anticorpos específicos

O título de anticorpos da classe de imunoglobulinas G (IgG) determinado em uma única amostra não discrimina infecção prévia ou em vigência, além da possibilidade de reações cruzadas com outras espécies de clamídia, especialmente a *Chlamydia pneumoniae*.

A pesquisa de anticorpos IgM como marcadores de infecção aguda é pouco confiável e frequentemente não são detectados quando a infecção é recorrente (15 ou mais sorotipos e outras espécies) (SCHACHTER; STAMM, 1999). Os testes sorológicos são de pouco valor, exceto em duas situações: no diagnóstico de pneumonite clamidial em recém-nascidos e no linfogranuloma venéreo. Testes de microimunofluorescência (MIF) para a pesquisa de anticorpos são utilizados como ferramenta epidemiológica em laboratórios de pesquisa.

2.3.5 Diagnóstico molecular de clamídia tracomatis

Devido à alta prevalência da infecção por clamídia, ao mercado crescente e à falta dos métodos tradicionais de diagnóstico desse agente etiológico, diversos testes comerciais que envolvem a detecção de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidos (BLACK, 1997). A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por clamídia, por ser mais rápido e sensível, além de não depender da viabilidade da amostra. Os métodos de detecção de ácidos nucleicos têm por alvo sequências gênicas da MOMP, do plasmídio críptico ou do rRNA de clamídia tracomatis. Testes que utilizam genes em múltiplas cópias apresentam sensibilidade elevada, como é o caso do rRNA e do plasmídio críptico de clamídia tracomatis, o qual está presente na ordem de sete a 10 cópias por corpo elementar (EB) (BLACK, 1997).

2.3.5.1 Hibridização de ácidos nucleicos

As sondas de DNA vêm sendo utilizadas há mais de 10 anos. O teste de hibridização utiliza uma sonda de DNA marcado com éster de acridina complementar à sequência de RNA ribossomal 16S do genoma da clamídia. O produto híbrido formado a partir de uma amostra positiva é absorvido por magnetismo e a quimiluminescência quantificada por um luminômetro. As amostras com mais de 6,0% de sangue são inadequadas, devido ao efeito de autofluorescência, podendo produzir resultados falso-positivos. A sensibilidade é próxima à da cultura, com a vantagem de permitir a detecção simultânea de *neisseria gonorrhoeae* e clamídia *tracomatis* (DORES *et al.*, 1999).

2.3.5.2 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A técnica mais conhecida dos NAATs é a PCR, que utiliza duas sequências sintéticas oligonucleotídicas, designadas de *primers*, complementares às regiões flanqueadas do segmento específico presente no microrganismo-alvo, sendo necessários também desoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) para sintetizar a nova cadeia, enzima DNA Taq polimerase, tampão para a enzima e cofactor MgCl₂. As cópias são originadas por ciclos térmicos constituídos por desnaturação, emparelhamento e extensão, que se repetem originando segmentos de DNA genômico ou de plasmídeo em milhões de cópias idênticas (BAKEN; HAAGENSEN; TOLKER-NIELSEN, 2007; BLACK, 1997). As cadeias novas, designadas de produtos de PCR, podem ser visibilizadas por electroforese em gel de agarose a 1,5% ou por hibridação com sondas específicas (BLACK, 1997).

A sensibilidade e especificidade da técnica de PCR dependem dos *primers* utilizados, da técnica de referência, do tipo de amostra, da população analisada, da preparação da amostra e do método de detecção do produto amplificado e de inibidores (SEADI; ORAVEC; ROSSETTI, 2002). A técnica de PCR pode ser específica de gênero ou espécie, dependendo do *design* dos *primers* (BAKEN; HAAGENSEN; TOLKER-NIELSEN, 2007). A sensibilidade e a especificidade

dessa técnica são de 80,3 a 91,7% e de 99,4 a 99,8% em amostras endocervicais, de 87,4 a 92,5% e de 95,2 a 98,8% em amostras uretrais masculinas, de 77,7 a 88,9% e de 98,5 a 99,8% em amostras de urina femininas e de 78,5 a 89,4% e de 98,9 a 99,7% em urinas masculinas, respectivamente (CDC, 2002).

A técnica de PCR foi modificada para aumentar sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico de clamídia, como, por exemplo, a técnica de multiplex PCR, na qual ocorre a amplificação de mais de um segmento de ácido nucleico na mesma reação, cada um com o seu par de *primers* específico. Numa técnica de multiplex PCR para a detecção de clamídia, usam-se normalmente dois pares de *primers* para amplificar um fragmento do gene *omp1* e um fragmento do gene do plasmídeo críptico (MAHONY *et al.*, 1995; 1997).

A técnica de Nested-PCR veio, igualmente, melhorar a especificidade e sensibilidade da reação. Nesta, um segmento de ácido nucleico é amplificado numa primeira etapa de forma abrangente, sendo depois esse produto de PCR utilizado para uma segunda reação de amplificação, aumentando, dessa forma, a especificidade da amplificação (CDC, 2002).

O desenvolvimento de uma técnica em que a visualização se faz em tempo real (RT-PCR) foi um grande avanço. Nesta, a visualização dos produtos de PCR em electroforese não é necessária, permitindo evitar contaminações e poupar tempo na obtenção dos resultados, além de também possibilitar a quantificação e reprodutibilidade nos resultados (JALAL *et al.*, 2006).

A RT-PCR utiliza, além de *primers*, sondas de DNA que emitem fluorescência à medida que o DNA de cadeia-dupla é sintetizado e a qual é medida e relacionada diretamente com a quantidade de DNA amplificado (JALAL *et al.*, 2007).

Tem ainda a vantagem de poder utilizar diversos *primers* e sondas específicas, transformando-se uma técnica RT-PCR em uma técnica de multiplex PCR em tempo real. No caso específico de clamídia tracomatis, pode-se pesquisar no mesmo tubo de reação sequências do fragmento de MOMP e do fragmento do

plasmídio críptico, com os *primers* e as sondas específicas de cada sequência (JALAL *et al.*, 2007; MARSHALL *et al.*, 2007).

2.3.5.3 Captura híbrida (HC)

O teste de captura híbrida (Digene) é um ensaio baseado em sonda de RNA e na amplificação do sinal de detecção. A sonda de RNA é homóloga à sequência completa do plasmídio crítico de clamídia *tracomatis* (7.500 pb) e a aproximadamente 39.000 pb do genoma dessa infecção (GIRDNER *et al.*, 1999). O teste apresenta-se em três diferentes formatos: HC II CT/NG, que é o teste de triagem e não diferencia *neisseria gonorrhoeae* e clamídia *tracomatis*; HC CT-ID, que é o teste específico para clamídia *tracomatis*, e HC GN-ID, que é o teste específico para *neisseria gonorrhoeae*. Já existe no mercado a segunda geração desse protocolo, que emprega um sistema semiautomatizado, porém apenas a apresentação manual tem aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) (VAN DER *et al.*, 2002). A sensibilidade do teste de HC para clamídia *tracomatis* varia de 95,4 a 97,2% frente a cultura e PCR (Amplicor CT-PCR, Roche); e a especificidade é superior a 99,0% em amostras endocervicais.

2.4 Associação entre clamídia e HPV

Estudos têm demonstrado que várias infecções sexualmente transmissíveis parecem atuar em conjunto com a infecção por HPV, aumentando o risco de neoplasia cervical ou câncer cervical invasivo (GOLIJOW *et al.*, 2005).

Há forte evidência epidemiológica que sugere que o HPV e a clamídia *tracomatis*, em particular os sorotipos de D a K, desempenham papel central na etiologia da NIC e, subsequentemente, no carcinoma cervical (TAMIM *et al.*, 2002). A infecção por clamídia *tracomatis* parece aumentar a suscetibilidade à infecção por HPV em um nível basal, por facilitar o acesso às células epiteliais basais por microabrasões ou por alterar as características das células epiteliais, aumentando a carga viral da infecção e facilitando a persistência do HPV. Alternativamente, a infecção concorrente por clamídia *tracomatis* pode impedir a resolução da

infecção por HPV a partir da indução de um padrão da resposta imune do tipo humoral. Além disso, a infecção por CT tem sido associada à hiperplasia de células de reserva e metaplasia, processos relacionados à carcinogênese cervical. A hipótese de que essa infecção interfere no curso da infecção por HPV precocemente é sustentada pelo fato de que o DNA de CT é detectado em esfregaço cervical realizado anos antes do diagnóstico de câncer (SAMOFF *et al.*, 2005).

A modulação da resposta imune humoral pela clamídia tracomatis certamente facilita ainda mais os mecanismos de evasão desenvolvidos pelo próprio HPV, tais como: a reduzida expressão de genes virais para reconhecimento imunológico, dificultando, assim, o reconhecimento pelas células imunocompetentes; a diminuição da expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II; a superexpressão da proteína oncogênica viral E7, que inibe a apresentação de antígenos pelas células dendríticas, menos suscetibilidade das células infectadas à lise mediada por linfócitos T citotóxicos; e também a evasão dos efeitos de inibição do crescimento provocado pelas citocinas (SCOTT; NAKAGAWA; MOSCICKI, 2001).

Em contrapartida, acredita-se ainda que modulação da resposta imune e/ou precipitação de resposta inflamatória favoreça uma subsequente infecção por clamídia tracomatis, aumentando a taxa de infectividade por essa bactéria em mulheres HPV-positivo (TAMIM *et al.*, 2002). Estudos têm demonstrado que a infecção por CT pode causar hiperplasia cervical em mulheres com ou sem NIC e carcinoma invasivo. Infecções simultâneas por CT e HPV estão relacionadas à alta expressão de Ki 67, um marcador de proliferação celular presente no núcleo de células em fase de multiplicação, no epitélio. A infecção por CT também aumenta a expressão de HPV16 nas NICs I, o que pode indicar que ela modifica a atividade do vírus (FISCHER, 2002).

Além disso, a infecção por clamídia tracomatis aumenta a expressão de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento transformante α (TGF- α), o que pode potencializar os mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical (FISCHER, 2002). Porém, a exata relação entre as infecções por HPV e

por clamídia tracomatis ainda não é bem entendida, ou seja, não está claro se a ela atua como um cofator para HPV ou como um fator de risco independente (TAMIM *et al.*, 2002).

Bellaminutti *et al.* (2014), analisando 441 amostras cervicais por RT-PCR, encontrou coinfeção HPV-CT em 17% e verificou que em pacientes abaixo de 25 anos essa prevalência atingiu 45%, realçando a necessidade de rastrear mulheres jovens para prevenção de NIC e infertilidade.

Magalhães *et al.* (2012), em estudo transversal, avaliou 1.134 amostras cervicais de mulheres brasileiras assintomáticas no Sul do Brasil, objetivando apurar a prevalência de HPV, clamídia e da coinfeção HPV-CT. Foi observada maior prevalência da coinfeção em mulheres abaixo de 32 anos e com múltiplos parceiros.

2.5 Mollicutes

Mollicutes é a única classe do filo *Tenericutes*. A classe é composta de quatro ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*), sete famílias (*Mycoplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Mycoplasmatales*), *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Acholeplasmatales*) e *Anaeroplasmataceae*), 11 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Phytoplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*) e mais de 200 espécies. A família *Mycoplasmataceae* contém os principais microrganismos de interesse médico, entre os quais estão os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*.

Quanto à forma, são pleomórficos, variando de estruturas esféricas ou em forma de balão para ramificada ou filamentos helicoidais. A replicação ocorre por fissão binária, mas pode ser precedida por uma divisão citoplasmática, que conduz à formação de filamentos multinucleadas. As colônias em meio sólido são muito pequenas (menores que 1 mm de diâmetro). Os organismos tendem a crescer e penetrar no interior do meio sólido. Sob condições adequadas, as colônias têm a

aparência característica de “ovo frito”. A maioria não apresenta motilidade. Possuem pequeno genoma (0,58–2,20 Mb), sendo consideradas as menores e mais simples bactérias autorreplicativas (BOVE, 1999). Devido a esse fato, são nutricionalmente exigentes, vivendo como parasitas dos mais diversos seres, como mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas. Os *habitats* principais de micoplasmas humanos e animais são as superfícies mucosas (ROTTEM, 2003).

As principais espécies que parasitam humanos encontram-se nos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, os quais possuem metabolismos distintos. Alguns micoplasmas são fermentadores, produzindo ácidos por meio da metabolização principalmente de glicose. E outros são não fermentadores, pois possuem a via da arginina-deidrolase para obtenção de ATP (BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007). As espécies do gênero *Ureaplasma* requerem ureia para produzir ATP, hidrolisando esse composto e produzindo amônia. Como não turvam o meio de cultura como as demais bactérias, seu crescimento é notado à medida que liberam produtos de seu metabolismo, mudando a cor do meio de cultura devido a um indicador de potencial hidrogeniônico (pH) adicionado ao meio de cultura (BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007).

2.5.1 *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma (M.) *genitalium* é um importante agente de DST, sendo responsável por uma série de desordens do trato urogenital humano. Apesar de sequenciado, existem poucos estudos sobre suas propriedades biológicas e fatores envolvidos no seu crescimento. Um dos principais desafios nos estudos dessa e de outras *mollicutes* de importância médica é a compreensão das infecções crônicas que podem persistir mesmo após tratamento antibiótico adequado.

O *Mycoplasma genitalium* pode causar uretrite no homem e salpingite na mulher, sendo detectado em 31% das trompas retiradas de 135 pacientes que tiveram salpingectomia por gravidez ectópica ou obstrução tubárea. Neste estudo, além do *mycoplasma*, também foram encontrados clamídia e herpes simples. Ashshi *et*

al. (2015) destacam a necessidade do rastreamento dessas DSTs em mulheres em idade fértil.

As culturas de *Mycoplasma genitalium* apresentam-se em forma de pequenos cocos, quando visibilizados à microscopia de campo escuro, não sendo observados detalhes de sua estrutura que, à microscopia eletrônica, pode ser detectada.

O genoma é constituído por aproximadamente 580 pares de bases, sendo dividido em 74 fragmentos pela enzima EcoRI. Os exatos mecanismos utilizados pelo *Mycoplasma genitalium* para causar inflamação e alterações patológicas associadas à uretrite ou infecções extragenitais ainda são desconhecidos. No entanto, têm sido realizados estudos sobre os fatores envolvidos na colonização e resistência contra as defesas naturais dos hospedeiros e do sistema imune (BACZYNSKA *et al.*, 2004; TAYLOR-ROBINSON, 2002).

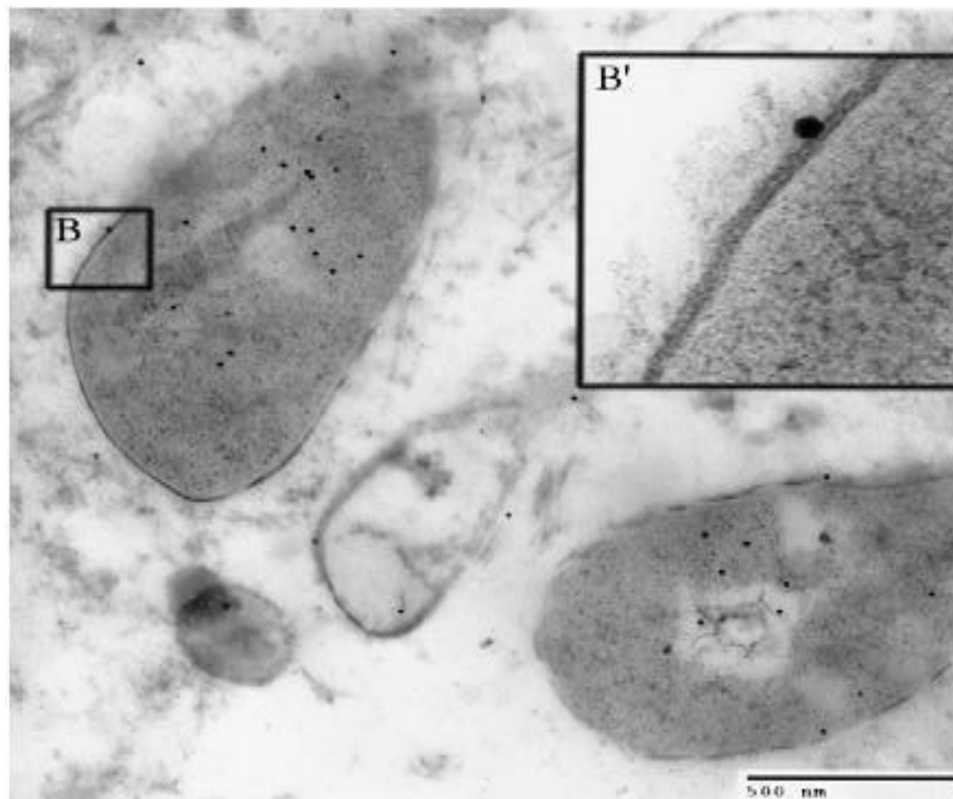
As infecções são iniciadas com a colonização da superfície mucosa, seguidas pela penetração no hospedeiro humano. O mecanismo de colonização do *Mycoplasma genitalium* é caracterizado pela citoaderência mediada pela sua porção apical (REDDY; RASMUSSEN; BASEMAN, 1996).

A habilidade em penetrar nas células hospedeiras, persistir em indivíduos infectados e possibilitar a recorrência após o tratamento antibiótico sugere que esse micoplasma pode evadir do sistema imune. Muitos estudos têm demonstrado que ele pode penetrar e persistir no interior das células epiteliais (BASEMAN *et al.*, 1995; JENSEN; BLOM; LIND, 1994). (Figura 5)

Ambas as análises transcricionais das frações do núcleo e imagens de células vivas infectadas contribuem para futuros estudos sobre a viabilidade e possível replicação associada ao parasitismo do *Mycoplasma genitalium*. Esses estudos poderão servir de ferramentas para estabelecer o melhor tratamento para as doenças causadas por esse micoplasma, pois não há protocolos adequados de tratamento (TOSH *et al.*, 2007). Além disso, a coexistência de diferentes DSTs comumente encontradas em um mesmo indivíduo (FORTENBERRY *et al.*, 1999)

é atribuída a vários fatores, incluindo, a rota comum de transmissão, o comportamento sexual e a composição da flora residente (MARTIN *et al.*, 1999).

FIGURA 5 - Micrografia eletrônica de amostra clínica de derivado de célula vaginal marcado e embebida em resina LR branca de epóxi



B) Painel mostrando o *Mycoplasma genitalium* na região intracelular, o qual foi marcado com anticorpo anti-M *genitalium*; B') Painel B ampliado mostrando o micoplasma intacto na membrana antes de invadir a célula.

Fonte: adaptado de Blaylock *et al.* (2004).

2.5.2 *Mycoplasma hominis*

Apresenta um genoma de 665 pb com conteúdo de guanina mais citosina de 27,1%. É uma espécie não glicolítica, produzindo energia a partir da degradação da arginina pela via da arginina di-hidrolase, essencial para promoção do seu crescimento *in vivo* (PEREYRE *et al.*, 2006). É considerado um patógeno oportunista que compõe o nicho natural do trato urogenital baixo, podendo ser encontrado como comensal em 20 a 50% de mulheres assintomáticas e chegar a

90% das mulheres atendidas em clínicas de DSTs. Entre os homens, as taxas de colonização variam entre 5% (assintomáticos) e 40% (sintomáticos).

Diversos fatores estão relacionados a esse agente no trato genital, destacando-se idade jovem, condição socioeconômica, atividade sexual com múltiplos parceiros e uso de anticoncepcionais orais (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Enquanto *Mycoplasma genitalium* não está claramente associado à vaginose bacteriana, o *Mycoplasma hominis*, juntamente com o *Ureaplasma urealyticum*, constitui fator relevante para a ocorrência de vaginose bacteriana. Embora *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma sp.* sejam os únicos micoplasmas genitais considerados como causa de cervicites e doença inflamatória pélvica (DIP), não se pode ignorar o poder infectivo do *Mycoplasma hominis* no epitélio vaginal (JENSEN, 2004).

Estudo de coorte realizado por Schlicht *et al.* referiu prevalência de *Mycoplasma hominis* em mulheres com sintomas de cervicites e uretrites de 26%, enquanto nenhum isolado foi detectado no grupo-controle constituído de mulheres assintomáticas. Os sintomas incluíam descarga vaginal ou uretral, dor à micção, dor pélvica e inflamação cervical (SCHLICHT *et al.*, 2004).

Segundo Yamagushi *et al.* (2011), o *Mycoplasma hominis* foi considerado microrganismo causal primário de febre puerperal após parto normal ou aborto. E as razões que poderiam explicar essa associação incluem o fato de o *Mycoplasma hominis* apresentar resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos, comumente utilizados nas infecções obstétricas, e as dificuldades para identificar laboratorialmente esse patógeno.

Choe *et al.* (2013), usando PCR multiplex para sete patógenos, encontraram prevalência de *Mycoplasma hominis* de 14,9%. Validaram a PCR usando outras técnicas, assim como pesquisaram as outras espécies de micoplasmas, salientando a importância da associação desse patógeno com vaginose e pielonefrite.

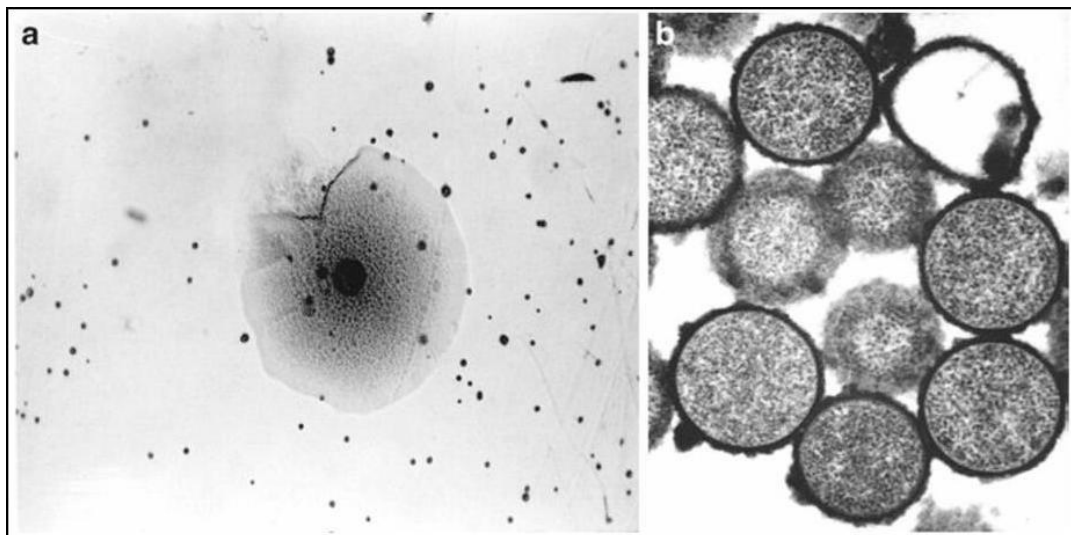
2.5.3 *Ureaplasma urealyticum*

A capacidade de metabolizar ureia e o tamanho diminuto das colônias conferem aos ureaplasmas características que os distinguem das demais *Mollicutes*. Em 1954, Shepard realizou o primeiro isolamento a partir do exsudato da uretra de pacientes com uretrite não gonocócica (UNG). Esses microrganismos foram denominados de diferentes formas, como “*tiny-form* PPLO”, “*T-form colonies of* PPLO” e, por fim, “*T-strain*” de *mycoplasma* (“T” de *tiny* = pequeno). Somente em 1974 foi proposto que se tratava de uma nova espécie, que então ficou conhecida como ureaplasma (isto é, forma que requer ou utiliza ureia) *urealyticum* (isto é, dissolve ou digere ureia) (SHEPARD *et al.*, 1974).

Apresentam-se como células cocóideas com cerca de 500 nm de diâmetro; pode aparecer como formas de coco-bacilo em fase de crescimento exponencial. Não apresentam motilidade e são anaeróbios facultativos. (Figura 6)

Assim como *Mycoplasma*, espécies de ureaplasma não possuem atividade nucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) oxidase. Ao contrário de outros *Mollicutes*, não possuem atividades de hexoquinase ou arginina deiminase, não sendo capazes de metabolizar glicose ou arginina. Têm a capacidade de metabolizar a ureia por meio de uma urease, hidrolisando em dióxido de carbono (CO₂) e amônia (NH₃) para geração de energia e crescimento. Seu genoma varia de 760-1170 kpb, com conteúdo G+C (mol%) na faixa de 25-32. São comensais ou patógenos oportunistas em hospedeiros vertebrados, principalmente aves e mamíferos (BERGEY'S, 2010).

FIGURA 6 - Tamanho e morfologia celular de ureaplasma



(a) Colônias isoladas de *Ureaplasma urealyticum*, cercando uma única grande colônia de *Mycoplasma hominis* em uma superfície de ágar sólido para micoplasmas. Colônias de *Ureaplasma urealyticum* comumente têm diâmetros de 15-125 mm; o diâmetro da colônia de *Mycoplasma hominis* mostrada é de aproximadamente 0,9 mm. (b) Micrografia eletrônica de transmissão de *Ureaplasma urealyticum*, sorotipo 4, cepa 381/74, que mostra células com morfologia cocoide, cápsula extramembranosa coradas com vermelho de rutênio, ausência de parede celular, apenas uma membrana e conteúdos citoplasmáticos aparentemente simples em que apenas ribossomos são evidentes. Diâmetros celulares de 485-585 nm.

Fonte: adaptado de Bergey's (2010).

Entre as 14 sorovares descritas, são verificadas variabilidades quanto ao tamanho do genoma, sendo de 760 kpb para sorovares pertencentes à biovar 1 e 840-1140 kpb para sorovares da biovar 2 (ROBERTSON *et al.*, 1990). Com o sequenciamento da serovar 3 feita por Glass *et al.* (2000), foi verificado baixo conteúdo G+C (25,5%), o menor entre os *Mollicutes* e um dos menores entre outras bactérias. Além disso, enzimas altamente conservadas em eubactérias parecem não ser codificadas por ureaplasmas, incluindo a proteína de divisão celular FtsZ, as chaperoninas GroES e GroEL e o ribonucleotídeo difosfato redutase (RDR).

A ligeira acidez da mucosa genital contribui para o desenvolvimento de ureaplasmas. Nesse sítio anatômico, produzem amônia, aumentando o pH genital e facilitando a colonização de outros microrganismos que são sensíveis ao pH ácido. *Ureaplasma parvum* sorovar 3 é mais frequentemente isolado do que *Ureaplasma urealyticum* (CASSELL *et al.*, 1993; GLASS *et al.*, 2000). No entanto, em alguns indivíduos, ambos podem estar presentes (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). *Ureaplasma urealyticum* está entre os principais

microrganismos responsáveis pelo estabelecimento de uretrites não gonocócicas e não clamidiais (CASSELL *et al.*, 1993). Pode causar gravidez anormal pela indução de vaginose bacteriana, cervicite, infecção intrauterina, pneumonia neonatal e pré-eclâmpsia (CASSELL *et al.*, 1993; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

Embora os ureaplasmas sejam um dos mais significativos *mollicutes* patogênicos em seres humanos, seu estudo é limitado pela dificuldade de obtenção de rendimento satisfatório em cultura de ureaplasmas. Cinco proteínas de *Ureaplasma spp.* foram inicialmente identificadas como possíveis fatores de virulência: urease, imunoglobulina A protease (IgA), o antígeno *multiple-banded antigen* (MBA) e fosfolipases C e A. Além disso, a cápsula tem sido descrita para *Ureaplasma spp.* No entanto, a virulência desses fatores ainda é incerta, pela dificuldade de modelos animais para o estudo de patogenicidade (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Analisando a frequência da associação de *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* nos distúrbios urogenitais, alguns estudos demonstraram que esses agentes podem interferir indiretamente no desenvolvimento de lesões cervicais, permitindo a persistência das infecções por HPV. Dessa maneira, ocorreria o início das anormalidades virais, que paralelamente à liberação dos metabólitos do conjunto infeccioso levaria ao aumento da inflamação tecidual. Além disso, *Ureaplasma urealyticum* foi descrito como causador de danos cromossômicos em cultura de células linfocíticas, efeito que ainda não está bem esclarecido (LUKIC *et al.*, 2006).

Verteramo *et al.* (2009) observaram a elevada associação entre *Ureaplasma urealyticum* e a infecção por HPV em pacientes com lesões cervicais. Lukic *et al.* (2006) analisaram 239 mulheres com anormalidades no exame citológico. *Ureaplasma urealyticum* foi detectado em 27% com diagnóstico para ASCUS, 35% para LSIL e 45% para HSIL, contra 19% para o grupo-controle. Evidenciou-se elevada associação entre as infecções por *Ureaplasma urealyticum* e HPV.

Ramirez-Salazar *et al.* (2011) ressaltaram que proteínas do HPV estão envolvidas nas alterações do ciclo celular e na apoptose de células, entretanto, é notável a necessidade de outros fatores para o estabelecimento da transformação celular para o câncer. Em estudo recente, foi sugerido que a infecção do trato urogenital por *Ureaplasma urealyticum* poderia aumentar o risco de câncer do colo do útero devido à superexpressão do oncogene E6 de HPV. Apesar destes demonstrarem a associação entre ureaplasmas e o HPV nas lesões de alto grau, outros ainda sugerem que infecções por *Ureaplasma urealyticum* podem provocar a apoptose (HARADA *et al.*, 2008).

Kriesel *et al.* (2015), usando PCR multiplex para nove agentes de DST em amostras de 295 pacientes americanas, obtiveram prevalência de 12% e prevalência também alta de micoplasma. Concluíram que é importante incluir esses patógenos na pesquisa das DSTs e que a PCR multiplex permite avaliação rápida e com boa sensibilidade e especificidade.

2.6 *Neisseria gonorrhoeae*

A *Neisseria gonorrhoeae* é um importante agente de DST. Em 2001, foi a segunda infecção mais frequente entre as notificadas nos Estados Unidos da América (EUA), com 361.705 casos (CDC, 2001). Em 2006, manteve-se em segundo lugar (em primeiro lugar estava clamídia tracomatis), com 358.366 casos notificados. Houve declínio de 74% nos índices de infecção gonocócica relatados de 1975 a 1997, quando permaneceram estáveis, mas estão aumentando nos últimos anos. Em 2006 ocorreram 120,9 casos para cada 100.000 habitantes, aumento de 5,5% em relação a 2005 (CDC, 2007). Entretanto, assim como no caso da clamídia tracomatis, a *Neisseria gonorrhoeae* é substancialmente pouco diagnosticada e notificada e aproximadamente duas vezes mais infecções que as notificadas são estimadas (WEINSTOCK; BERMAN; CATES, 2004).

A prevalência da infecção por *Neisseria gonorrhoeae* pode variar de acordo com o gênero, faixa etária, etnia, sintomas, local do estudo e o teste empregado para o diagnóstico, o que dificulta sua real determinação. Os indivíduos mais afetados

pela infecção gonocócica são as mulheres com idade de 25 anos ou mais. Nos EUA, os níveis mais altos de infecção estão entre as adolescentes sexualmente ativas, os adultos jovens e os negros (CDC, 2007). Em países em desenvolvimento esse quadro se mantém.

No Brasil, os estudos sobre a prevalência e incidência da infecção por *Neisseria gonorrhoeae* são escassos. Segundo estimativas da Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (CNDST/AIDS), em 2001 ocorreram cerca de 600.000 casos de infecção gonocócica. Os dados publicados representam estudos isolados, realizados em populações ou serviços específicos, porém mostram a importância dessa infecção no país. Alguns autores encontraram, em mulheres, prevalências que variaram de 0,6 a 12% nos últimos 15 anos (BRASIL, 2008). Essa ampla variação pode estar associada à utilização de diferentes testes no diagnóstico laboratorial e a populações com diferentes comportamentos de risco e características sociodemográficas, sintomáticas ou não, o que dificulta a comparação dos resultados.

Entre os fatores de risco comportamentais e demográficos associados à infecção por gonococo, destacam-se: a baixa idade, o início precoce da atividade sexual, o maior número de parceiros sexuais, a troca frequente de parceiro, o estado civil solteiro, o uso inadequado de preservativos, as baixas condições socioeconômicas, outras DSTs e ter parceiro com sintomas urogenitais (DiCIEMENTE *et al.*, 2008).

A *Neisseria gonorrhoeae* é um diplococo Gram-negativo (ou gonococo), aeróbio, não capsulado, que pode ser encontrado dentro de polimorfonucleares, mas em infecções iniciais também fora das células. Acredita-se que o homem seja o único vetor e hospedeiro (PASSOS, 2005). É transmitida pelo contato sexual com indivíduos infectados, com período de incubação geralmente de dois a cinco dias e o período de transmissibilidade pode durar meses a anos se o paciente não for tratado (BRASIL, 2006).

Na mulher, as infecções assintomáticas são frequentes, podendo chegar a 70% (AZULAY; AZULAY, 1998; WORKOWSKI; LEVINE, 2002). Quando presentes, os sintomas caracterizam-se por disúria e ardor miccional, além de secreção vaginal mucosa ou purulenta, com pouco odor e dispareunia, porém estes são pouco específicos. Ao exame físico, o colo pode estar hiperemiado, com visibilização da secreção já descrita e facilmente sangrante (cervicite). O quadro pode evoluir para diversas complicações, sendo a DIP a mais importante, com sintomas iniciais de dor abdominal e febre, podendo chegar a abscessos pélvicos e dor pélvica crônica, quando não tratada adequadamente. Aproximadamente 1 milhão de mulheres por ano nos EUA desenvolvem DIP (CDC, 2007). Cerca de 10 a 20% das mulheres com gonorreia não tratada evoluem para salpingite aguda e DIP. Esta última pode causar infertilidade em 15% das pacientes, chegando a 50% naquelas com três ou mais episódios (WORKOWSKI; LEVINE, 2002). É também bem estabelecida a relação entre gonorreia, DIP e gravidez ectópica (GRAY-SWAIN; PEIPERT, 2006).

A identificação da *Neisseria gonorrhoeae* pode ser feita pelo Gram, pela cultura ou por testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs). O Gram consiste na visibilização microscópica de diplococos Gram-negativos intracelulares e nas amostras endocervicais tem baixa sensibilidade (em torno de 30-65%), enquanto a especificidade pode chegar a 99% (CDC 2007; SHIPITSYNA *et al.*, 2008).

O desenvolvimento dos NAATs no início da década de 90 foi um importante avanço no diagnóstico da *Neisseria gonorrhoeae*. Eles consistem na amplificação de um fragmento ou sequência de DNA gonocócico, inclusive de organismo não vivo, a partir de PCR ou reação em cadeia da ligase (LCR), este último retirado do mercado em 2002. As técnicas comercialmente disponíveis mostram alta sensibilidade e especificidade (90-100%), variando de acordo com a técnica empregada. Podem usar como amostras secreção endocervical ou uretral colhidas por *swab* (inclusive autocoleta vaginal) ou ainda urina. Têm como vantagens a possibilidade de diagnóstico em indivíduos assintomáticos (sendo uma opção interessante para rastreio) e o fácil transporte, além de poderem utilizar material não invasivo, como urina ou autocoleta vaginal. Entretanto, não permitem o estudo de suscetibilidade ou de resistência antimicrobiana e são

caros, não estando disponíveis em todos os laboratórios, principalmente em países em desenvolvimento (WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006). Além disso, estudos têm revelado que, dependendo da técnica utilizada, podem apresentar diminuição na sensibilidade em amostras de urina feminina (até 66,7%) e aumento de falso-positivos em população de alta prevalência, por detectarem também espécies não patogênicas de neisseria (VAN DOORNUM *et al.*, 2001). A PCR, junto com a cultura, representa hoje o padrão-ouro no diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* (BRASIL, 2006; CDC, 2002).

3 JUSTIFICATIVA

O carcinoma cervical é uma doença que ainda ocorre no Brasil de forma expressiva, com alta mortalidade devido ao diagnóstico tardio. A detecção precoce de lesões pré-cancerígenas, com intervenção adequada, pode reduzir as taxas de morbimortalidade entre as mulheres.

Sabe-se que a presença de HPV cervical é condição indispensável para o surgimento das neoplasias intraepiteliais cervicais, precursoras do câncer. Entretanto, nem todas as mulheres infectadas pelo HPV irão desenvolver essas lesões precursoras, que estarão na dependência da presença de outros cofatores, entre eles, as DSTs.

Confirmar se alguma DST pode se associar ao HPV, e contribuir para o surgimento das neoplasias intraepiteliais cervicais, certamente será uma nova informação científica relevante.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Conhecer a frequência de infecção genital por papilomavírus humano, clamídia tracomatis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e ureaplasma em mulheres assintomáticas de baixo e alto risco para NIC (ambulatório de ginecologia geral e de propedêutica do colo uterino da Santa Casa de Belo Horizonte).

4.2 Objetivos específicos

- a) Descrever os fatores de risco para NIC.
- b) Identificar a associação dessas infecções com NIC.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte (CEP/SCBH) (protocolo número nº: 475.165 - ANEXO C), segundo a legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. O material biológico aqui utilizado foi obtido com o consentimento das pacientes que aceitaram ser voluntárias na pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C).

5.2 Seleção de pacientes

5.2.1 Local e período das coletas

As amostras de exame citológico, biópsia e esfregaço cervical foram obtidas no Ambulatório de Ginecologia Geral e de Patologia do Colo do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte, no período de outubro de 2014 a outubro de 2015. As amostras foram armazenadas inicialmente no Laboratório BIOCOD Biotecnologia Ltda., onde foi realizada a extração do DNA, e a seguir no biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) da Santa Casa de Belo Horizonte, onde foram realizadas a PCR para HPV e a RT-PCR para as DSTs.

5.2.2 Critérios de inclusão

Participaram do estudo pacientes do sexo feminino com idade de 18 anos ou mais, do ambulatório de patologia cervical, que apresentavam exame citológico

normal, lesões de baixo grau (NIC I) e lesões de alto grau (NIC II/NIC III). Para o grupo-controle (baixo risco) foram incluídas as pacientes encaminhadas do ambulatório geral com citologia cervical normal, em consulta de rotina ou de pré-operatório. As pacientes foram selecionadas independentemente da idade e da fase hormonal em que se encontravam.

5.2.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas pacientes menores de idade, as histerectomizadas e aquelas nas quais a coleta de amostras foi impossibilitada por algum motivo. Também foram excluídas pacientes grávidas ou com diagnóstico de carcinoma invasor.

5.2.4 Abordagem das pacientes

As pacientes que compareciam para o ambulatório de propedêutica de colo do útero e de ginecologia geral eram convidadas a participar do estudo, sendo esclarecidas sobre todos os procedimentos que seriam realizados. Aquelas que aceitaram participar assinaram o TCLE e responderam a um questionário (APÊNDICE A) no qual as perguntas já faziam parte da anamnese do ambulatório.

Para a pesquisa, foi coletada de cada paciente uma amostra de esfregaço do colo uterino para a realização de PCR para HPV e outras DSTs: clamídia, *Mycoplasma hominis* e *genitalium*, neisseria e ureaplasma e amostra para citologia cervical. Quando indicado, foi realizada biópsia do colo uterino daquelas pacientes que apresentavam lesão visibilizadas à colposcopia. Os resultados das biópsias foram avaliados histologicamente pelo patologista Dr. Maurício Buzelin Nunes, do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Belo Horizonte. O resultado histopatológico foi considerado o padrão-ouro para diagnóstico de NIC.

5.2.5 Amostras obtidas

As amostras cervicais foram coletadas com escova ginecológica e colocadas em microtubos de 1,5 mL com 1 mL de álcool a 70,0%. A seguir, foi extraído o DNA para avaliação da infecção pelo HPV, clamídia, *Mycoplasma hominis* e *genitalium*, neisseria e ureaplasma. Todas as amostras coletadas neste estudo agora fazem parte do Banco de Material Biológico do IEP da Santa Casa de Belo Horizonte (BMB/IEP/SCBH) e poderão ser utilizadas em outras pesquisas após aprovação pelo CEP.

5.2.6 Grupos analisados

Foram selecionadas aleatoriamente para a pesquisa 126 pacientes, sendo 55 do ambulatório de ginecologia geral (baixo risco para NIC) classificadas como grupo 1; e 71 do ambulatório de propedêutica do colo (alto risco para NIC) classificadas como grupo 2.

5.2.7 Coleta de material para citologia

Para a coleta de material para citologia oncológica, foram utilizadas espátulas de Ayre e escova (“*citobrush*”). Os laudos foram emitidos segundo a classificação de Bethesda (APENDICE B).

5.2.8 Colposcopia

Foi utilizado o colposcópio Vasconcelos, modelo padrão. Após a paciente ser colocada na posição de litotomia e o colo estar exposto, foi aplicada solução de ácido acético a 3% sobre o colo uterino, com o objetivo de pesquisar áreas acetobranças, pontilhados, mosaicos e vascularização atípica.

Depois da primeira avaliação, o colo foi corado com teste de Schiller e novamente observado ao colposcópio.

O passo seguinte foi a aplicação de bissulfito de sódio a 5% para descolorir o colo. O ácido acético a 3% foi reaplicado com o intuito de relacionar as áreas acetobranças às áreas iodo-negativo. A classificação das lesões cervicais seguiu terminologia colposcópica internacional ratificada pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia, RIO 2011 (ANEXO A).

5.2.9 Biópsia

Toda lesão foi biopsiada sob visão colposcópica, utilizando-se a pinça de Gaylor-Medina. O material biopsiado foi fixado em formol a 10% e processado para estudo histopatológico

de rotina. Foram feitos cortes com 5 µm de espessura nos blocos de parafina, corados pela hematoxilina-eosina e examinados na rotina do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Belo Horizonte.

A análise e descrição histopatológica foram baseadas na classificação proposta por Richart (1973 *apud* WRIGH; KURMAN; FERENCZY, 2002, p. 256) - Terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical, segundo a orientação de Wright *et al.* (1994), baseada na classificação de Richart (1973 *apud* WRIGH; KURMAN; FERENCZY, 2002, p. 256) (ANEXO B).

5.2.10 Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras cervicais utilizou-se o QIAmp® DNA *Blood* minikit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

5.2.11 Detecção de HPV

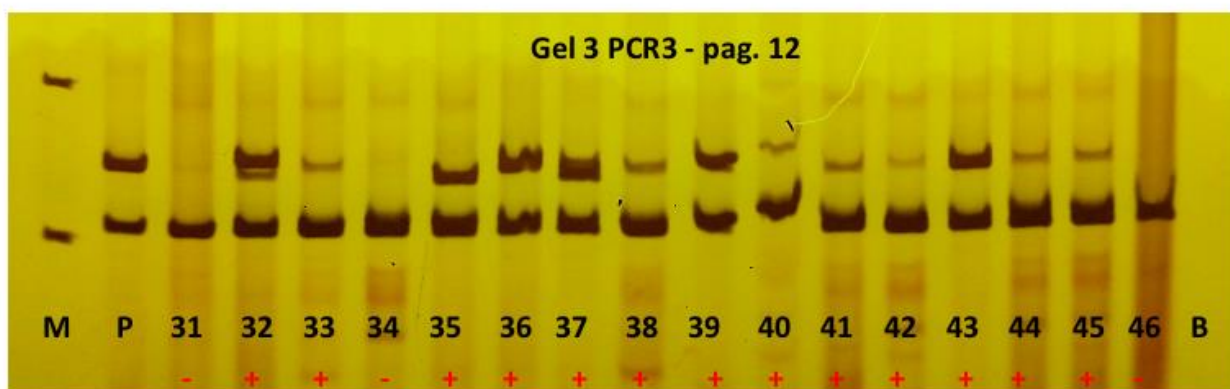
Foi realizada pela PCR, utilizando os *primers* gerais GP5+ e GP6+ (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995), para a detecção do DNA HPV. Esses *primers* amplificam um fragmento de 150 pb da região L1 do DNA viral comum a todos os tipos de

HPV. Como controle interno de reação, foi utilizada a betaglobina (PCO3+ / PCO4+). As sequências de todos os *primers* encontram-se no QUADRO 3. A figura 7 mostra uma placa de eletroforese como ilustração.

QUADRO 3 – *Primers* utilizados na detecção de HPV

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Amplicons (pb)	Referência
GP5+ GP6+	TTTGTTACTGTGGTAGATAC GAAAATAAACTGTAAATCA	150	De Roda Husman <i>et al.</i> (1995)
PCO3+ PCO4+	ACACAACACTGTGTTCACTAGC CAACTTCATCCACGTTCCACC	100	Saiki <i>et al.</i> (1985)

FIGURA 7 – Eletroforese em gel poliacrilamida 10% dos amplicons da PCR para detecção do HPV



B = controle de contaminação; M = marcador de peso molecular (100 pb); Raias 1 a 4 e 6 a 10 = amostras HPV-positivo; Raias 5 e 11 = amostras HPV-negativo; Amplicon em 150 pb = positividade para HPV com *primers* GP5/GP6. Amplicon em 110 pb = controle interno de reação da β -globina.
Fonte: do autor.

O *mix* de reação foi constituído de: 1,4X do tampão de reação, 0,2 mM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 0,6 μ M de cada *primer*, 0,2 μ M do *primer* betaglobina, 0,1 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha), aproximadamente 20 ng de DNA genômico e q.s.p 12 μ L de água deionizada autoclavada.

As etapas seguidas nas condições de ciclagem da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 37 ciclos subsequentes de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 45°C por 45 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Por último, mais um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

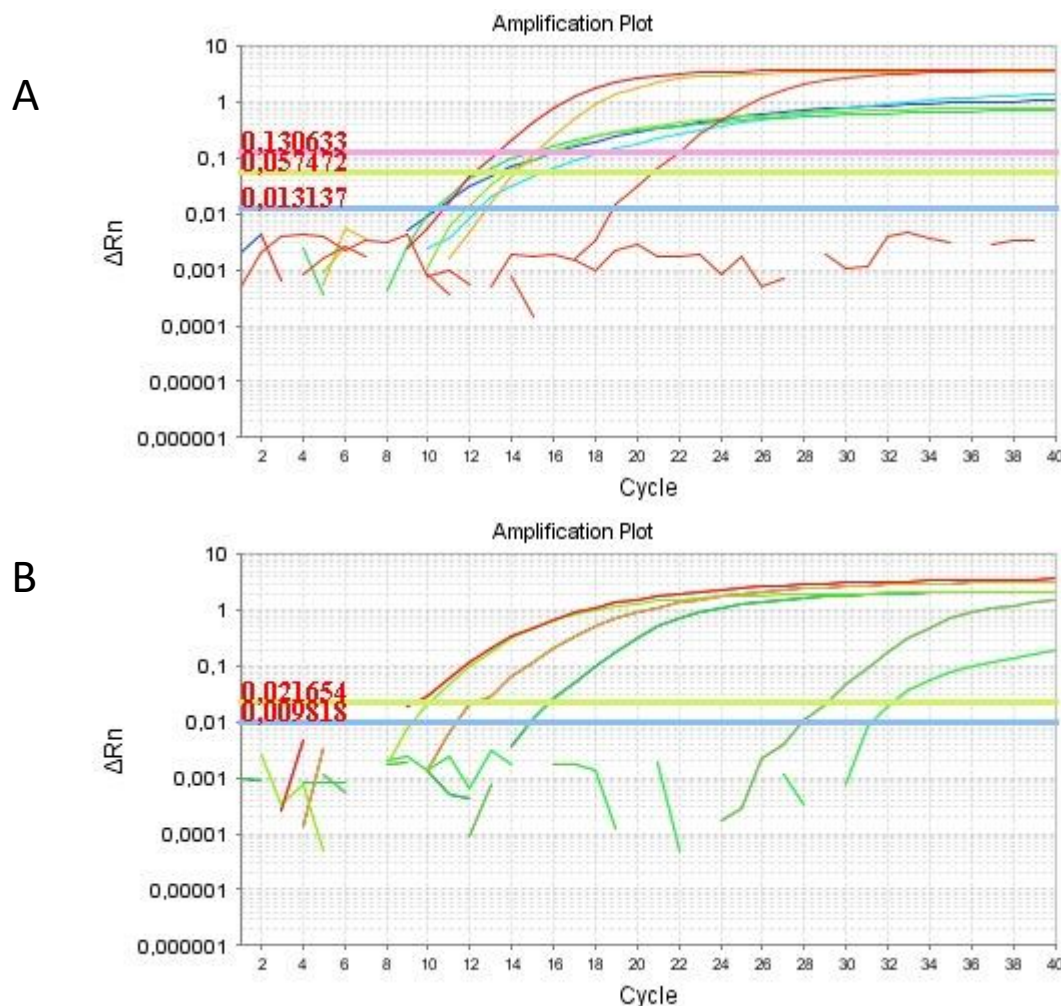
Para a visualização dos resultados, os produtos da PCR foram aplicados em géis de poliacrilamida não desnaturante a 10% e submetidos à eletroforese vertical. A coloração foi realizada com nitrato de prata, adaptado de Sanguinetti, Dias Neto e Simpson (1994). Utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Brasil) para comparação das bandas amplificadas, em todas as corridas eletroforéticas.

5.2.12 PCR para DSTs

A detecção dos agentes infecciosos causadores das DSTs incluídas neste estudo foi realizada em reações de PCR multiplex em tempo real e divididas em dois tipos de Multiplex-qPCR, de acordo com os agentes infecciosos incluídos:

- a) Multiplex I (M I): *Neisseria gonorrhoeae*, clamídia Tracomatis.
- b) Multiplex II (M II): *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*. (Figura 8)

FIGURA 8 – PCR multiplex em tempo real para as DSTs



Curva de amplificação das qPCRs para detecção de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* (A), *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (B).
Fonte: do autor.

Essas reações foram realizadas em um termociclador 7.500 RT-PCR System (*Applied Biosystems*, Foster CA, EUA), empregando-se o sistema de detecção TaqMan (*Applied Biosystems*, Foster CA, EUA). Os ensaios foram realizados utilizando-se 12,5 μ L de TaqMan Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster CA, EUA), concentrações previamente determinadas para iniciadores e sondas correspondentes ao grupo de genes do estudo, bem como o volume de DNA padronizado, perfazendo volume final de 25 μ L de reação. Os ensaios foram realizados em duplicata para todos os genes e os resultados foram analisados com o auxílio do software 7500 Fast v 2.01 (*Applied Biosystems*, EUA). Os

valores de *baseline* e ciclo *threshold* usados foram ajustados automaticamente para cada ensaio.

5.3 Análise estatística

A análise foi dividida em etapas explicadas a seguir.

5.3.1 Análise descritiva dos grupos

Iniciou-se a avaliação pela análise descritiva dos grupos: pacientes do ambulatório geral (baixo risco para NIC) e pacientes do ambulatório de propedêutica do colo (alto risco para NIC). Nessa etapa foram analisadas as variáveis: idade, início de atividade sexual, número de parceiros e método anticoncepcional a partir das medidas das médias e medianas, por meio do teste de U-Mann-Whitney. Essas variáveis foram transformadas em categóricas para, em seguida, iniciar-se a análise univariada.

5.3.2 Análise univariada

Essa etapa teve como objetivo verificar a possível associação entre as variáveis independentes, citadas a seguir, e a variável independente (desfecho), NIC. Foram consideradas variáveis independentes: idade; início de atividade sexual; tabagismo; número de parceiros; método anticoncepcional; ser paciente do ambulatório geral ou do ambulatório de propedêutica do colo (grupo 1 e grupo 2); HPV; clamídia; neisseria; *Mycoplasma genitalium*; *Mycoplasma hominis*; e ureaplasma. Outras variáveis independentes foram criadas a partir das variáveis originais: coinfeção HPV/clamídia; coinfeção HPV/*Mycoplasma genitalium*; e coinfeção HPV/DST (uma ou mais DSTs). Compararam-se também essas variáveis com a variável resposta ambulatório geral e propedêutica do colo. Foram utilizados os testes U-Mann-Whitney e qui-quadrado para detectar a existência de associações, considerando-se o nível de significância de 0,05.

Nessa etapa também foram selecionados os potenciais preditores para as regressões múltiplas, usando-se o nível de significância de 0,15.

5.3.3 Análise multivariada

Para verificar a associação das DSTs com NIC foi utilizada a regressão logística binária a partir do algoritmo de Backward. Para avaliar a qualidade do ajuste das regressões logísticas, foi realizado o teste de Hosmer-Lemeshow. O *software* usado foi o *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Statistics 17.0*.

6 RESULTADOS

Foram avaliadas 126 pacientes, tendo 55 sido atendidas no ambulatório de ginecologia geral e 71 atendidas no ambulatório de propedêutica do colo. As pacientes foram distribuídas em dois grupos:

Grupo 1 - pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia geral (n=55).

Grupo 2 - pacientes atendidas no ambulatório de propedêutica do colo do útero (n=71).

A idade média das pacientes, analisando os dois grupos em conjunto, foi de 35,85 anos e a mediana de 35 anos. Quanto ao número de parceiros, 55,1% relataram mais de cinco parceiros. Apenas 18,8% eram tabagistas. A idade média no início da atividade sexual foi de 18,6 anos e a mediana de 18 anos. As pacientes foram categorizadas em usuárias de anticoncepcional hormonal e usuárias de outros métodos, incluindo nesse grupo as pacientes que não usavam método anticoncepcional; 71 pacientes referiam uso de anticoncepcional hormonal, significando 55,9% das pacientes.

A TAB. 1 mostra as características das pacientes de cada grupo quanto a: idade, número de parceiros, tabagismo, início da vida sexual e método anticoncepcional. Não houve diferença entre os grupos em relação a todas essas variáveis. Quanto ao tabagismo, chama atenção a baixa frequência de fumantes nos dois grupos: entre as 126 pacientes, somente 24 eram tabagistas.

TABELA 1 - Características epidemiológicas das pacientes de acordo com os grupos: ambulatório geral (grupo 1) e propedêutica do colo (grupo 2)

Variáveis		Grupo 1 N=56		Grupo 2 N=71		Total n	P- valor	OR	IC 95%
		n	%	n	%				
Idade	<35 anos	26	40,0	39	60,0	65	0,261	1,50	0,73-3,04
	≥35 anos	30	50,0	30	50,0	60			
Parceiros	> 5	23	40,4	34	59,6	57	0,401	1,35	0,66-2,75
	≤ 5	33	47,8	36	52,2	69			
Tabagismo	Sim	9	37,5	15	62,5	24	0,447	1,42	0,57-3,55
	Não	47	46,1	55	53,9	102			
Início atividade sexual	<18	28	38,9	44	61,1	72	0,121	1,76	0,85-3,60
	≥18	28	52,8	25	47,2	53			
Método anticoncepcional	Sim	33	47,8	36	52,2	69	0,401	0,738	0,36-1,50
	Não	23	40,4	34	59,6	57			

OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

A TAB. 2 mostra as características das pacientes atendidas no ambulatório de patologia do colo (grupo 2) quanto a: citologia, realização ou não de biópsia, presença ou não de NIC e grau de NIC. Foram realizadas biópsias em 44 pacientes, entre as quais 33 tinham NIC, sendo 18 NIC I e 15 NIC II/III.

Todas as pacientes do grupo 1 apresentavam citologia normal (uma delas teve citologia LSIL e foi transferida para o grupo 2).

TABELA 2 - Características das pacientes atendidas no ambulatório de patologia do colo

Variável		Grupo 2 n= 71	
		n	%
Citologia	Alterada	47	83,9
	Normal	24	42,8
Biópsia	Sim	44	78,5
	Não	21	37,5
NIC	Com NIC	33	58,9
	Sem NIC	11	19,6
Grau de NIC	II/III	15	26,7
	I	18	32,14

Na TAB. 3 registram-se as características das pacientes com e sem NIC quanto a: idade, número de parceiros sexuais, tabagismo, início da atividade sexual e método anticoncepcional.

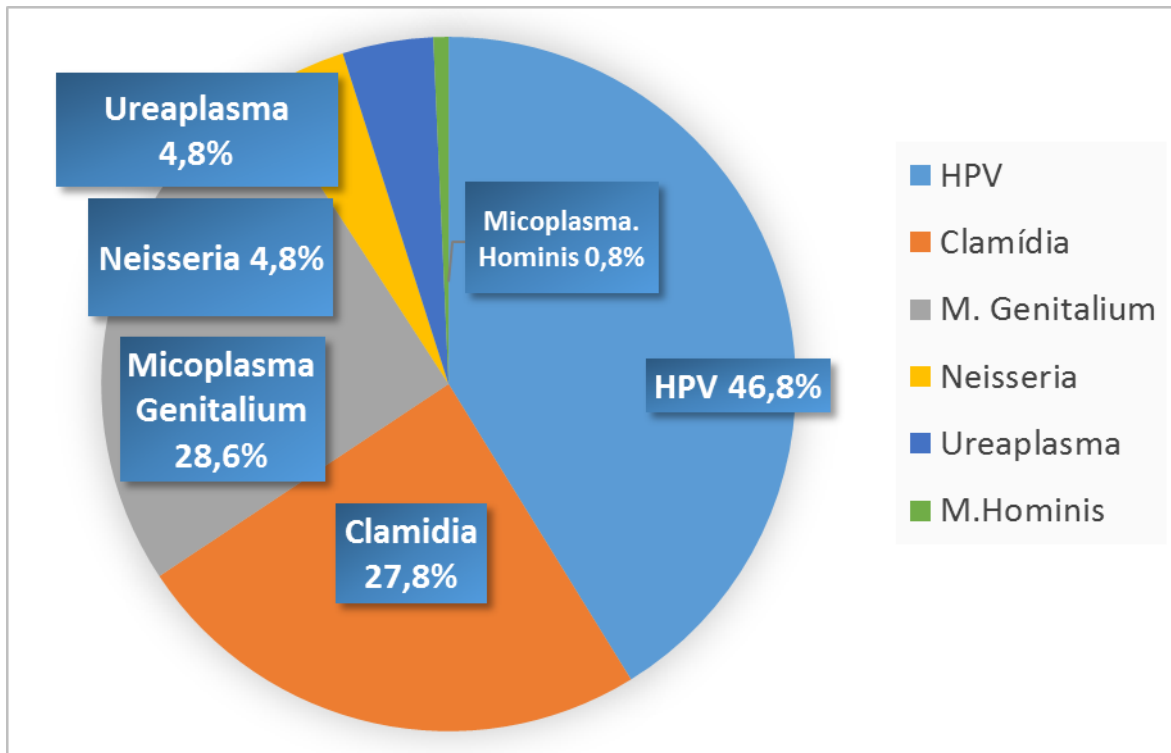
Entre as 33 pacientes com NIC, 19 tinham menos de 35 anos, 15 tinham mais de cinco parceiros sexuais, seis eram tabagistas, 22 tinham iniciado vida sexual antes dos 18 anos e 14 faziam uso de método anticoncepcional.

TABELA 3 - Características epidemiológicas das pacientes com e sem neoplasia intraepitelial cervical

Variável	Com NIC (n=33)		Sem NIC (n=93)		Total	P- valor	OR	IC 95%	
	n	%	n	%					
Idade (anos)	<35	19	29,2	46	70,8	65	0,333	1,49	0,66-3,37
	≥35 anos	13	21,7	47	78,3				
Nº parceiros	>5	15	26,3	42	73,7	57	0,977	1,01	0,45-2,24
	≤ 5	18	26,1	51	73,9				
Tabagismo	Sim	6	25,0	18	75,0	24	0,883	0,92	0,33-2,57
	Não	27	26,5	75	73,5				
Início da atividade sexual (anos)	≤18	22	30,6	50	69,4	72	0,219	1,68	0,73-3,86
	>18	11	20,8	42	79,2				
Método anticoncepcional	Sim	14	20,3	55	79,7	69	0,097	0,50	0,22-1,13
	Não	19	33,3	38	66,7				

O GRÁF. 1 ilustra a frequência das DSTs entre as 126 pacientes atendidas: 66,6% delas tinham pelo menos uma DST; 59 eram HPV-positivo (46,8%); 35 apresentavam clamídia (27,8%); seis tinham neisseria (4,8%); seis tinham ureaplasma (4,8%); uma tinha *Mycoplasma hominis* (0,8%); e 36, *Mycoplasma genitalium* (28,6%).

GRÁFICO 1 - Frequência das DSTs (n=126)



Na TAB. 4 percebe-se a frequência das DSTs nos dois grupos. No grupo 1, 30,5% das pacientes eram HPV-positivo e no grupo 2, 69,5% eram positivas para HPV. O *Mycoplasma genitalium* distribuiu-se igualmente nos dois grupos.

TABELA 4 - Frequência das DSTs nos dois grupos: ambulatório geral (grupo 1) e propedêutica do colo (grupo 2)

DSTs		Grupo 1 (n=55)		Grupo 2 (n=71)		Total	P - valor	OR	IC 95%
		n	%	n	%				
HPV	Pos	18	30,5	41	69,5	59	0,003	2,98	1,43-6,22
	Neg	38	56,7	29	43,3	67			
Clamidia	Pos	13	37,1	22	62,9	35	0,306	1,51	0,68-3,37
	Neg	43	47,3	48	52,7	91			
Neisseria	Pos	3	50,0	3	50,0	6	0,779	0,79	0,15-4,07
	Neg	53	44,2	67	55,8	120			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Pos	16	44,4	20	55,6	36	1,000	1,00	0,45-2,17
	Neg	40	44,4	50	55,6	90			
<i>Mycoplasma hominis</i>	Pos	01	100,0	0	0	1	0,444	2,27	1,86-2,77
	Neg	55	44,0	70	56,0	125			
Ureaplasma	Pos	3	50,0	3	50,0	6	0,549	0,79	0,15-4,07
	Neg	53	44,2	67	55,8	120			

A TAB. 5 avalia a frequência das pacientes com DSTs em relação à NIC. 42,9% das pacientes com clamidia eram portadoras de NIC ($p=0,009$); 35,6% das pacientes com HPV tinham NIC ($p=0,024$); e 38,9% daquelas com *Mycoplasma genitalium* tinham NIC (0,040). Considerando as outras DSTs, não houve significância estatística.

TABELA 5 - Frequência das pacientes com DSTs em relação à ocorrência de neoplasia intraepitelial cervical

DSTs		Com NIC		Sem NIC		Total	P - valor	OR	IC 95%
		n	%	n	%				
Clamídia	Pos	15	42,9	20	57,1	35	0,009	3,04	1,30-7,08
	Neg	18	19,8	73	80,2	91			
HPV	Pos	21	35,6	38	64,4	59	0,024	2,53	1,11-5,75
	Neg	12	17,9	55	82,1	67			
Neisseria	Pos	01	16,7	5	83,3	6	0,503	0,55	0,62-4,88
	Neg	32	26,7	88	73,3	120			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Pos	14	38,9	22	61,1	36	0,040	2,37	1,02-5,50
	Neg	19	21,1	71	78,9	90			
<i>Mycoplasma hominis</i>	Pos	0	0	1	100,0	1	0,738	1,35	1,22-1,50
	Neg	33	26,4	92	73,6	125			
Ureaplasma	Pos	0	0	6	100,0	6	0,155	1,37	1,23-1,54
	Neg	33	27,5	87	72,5				

A TAB. 6 mostra as pacientes com HPV e, simultaneamente, uma ou mais DSTs em relação à NIC. Entre 29 pacientes que apresentavam essa associação (HPV+DST), 44,8% tinham NIC. Foram avaliadas e relacionadas também à NIC as coinfeções HPV + clamídia e HPV + *Mycoplasma genitalium*.

- a) HPV + clamidia - entre 19 pacientes, nove tinham NIC (47,4%);
 b) HPV + *Mycoplasma genitalium* - entre 19 pacientes, seis tinham NIC (31,6%).

TABELA 6 - Frequência das DSTs associadas ao HPV em relação à ocorrência de neoplasia intraepitelial cervical

Variável		Com NIC		Sem NIC		Total	P - valor	OR	IR 95%
		n	%	n	%				
HPV + DST	Sim	13	44,8	16	55,2	29	0,011	3,12	1,29-7,55
	Não	20	20,6	77	79,4	97			
HPV+Clamídia	Sim	9	47,4	10	52,6	19	0,023	3,11	1,13-8,53
	Não	24	22,4	83	77,6	107			
HPV + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Sim	6	31,6	13	68,4	19	0,562	1,36	0,47-3,95
	Não	27	25,2	80	74,8	107			

Na TAB. 7 observam-se as variáveis que foram selecionadas para a análise multivariada. Foi utilizado p-valor de 0,15 para a seleção das variáveis preditoras no modelo univariado.

TABELA 7 - Variáveis selecionadas para a análise multivariada

Variável		Com NIC N=33		Sem NIC N=93		Total	P - valor	OR	IR 95%
		n	%	n	%				
Clamídia	Sim	15	42,9	20	57,1	35	0,009	3,04	1,30-7,08
	Não	18	19,8	73	80,2	91			
HPV	Sim	21	35,6	38	64,4	59	0,024	2,53	1,11-5,75
	Não	12	17,9	55	82,1	67			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Sim	14	38,9	22	61,1	36	0,040	2,37	1,02-5,50
	Não	19	21,1	71	78,9	90			
Ureaplasma	Sim	0	0	6	100,0	6	0,155	1,37	1,23-1,54
	Não	33	27,5	87	72,5	120			
HPV + DST	Sim	13	44,8	16	55,2	29	0,011	3,12	1,29-7,55
	Não	20	20,6	77	79,4	97			
HPV+Clamídia	Sim	9	47,4	10	52,6	19	0,023	3,11	1,13-8,53
	Não	24	22,4	83	77,6	107			
Método anticoncepcional	Sim	14	20,3	55	79,7	69	0,097	0,50	0,22-1,13
	Não	19	33,3	38	66,7	57			

Registra-se na TAB. 8 o resultado final da análise multivariada. A infecção pelo HPV e pela clamídia revelaram associação significativamente independente com a neoplasia intraepitelial cervical.

TABELA 8 - Modelo final da análise multivariada por regressão logística para a variável resposta NIC

Variável	P- valor	OR	IC 95%
Clamídia	0,028	2,69	1,11-6,53
HPV	0,040	2,48	1,04-5,92

7 DISCUSSÃO

A proposta inicial deste estudo era avaliar a frequência de DSTs em pacientes assintomáticas e, ao mesmo tempo, a infecção pelo HPV. Interessava utilizar um teste de biologia molecular, no caso uma PCR multiplex real time, para identificar cinco DSTs: clamídia, gonococo e as *mollicutes* (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* e ureaplasma). Decidiu-se verificar a frequência dessas DSTs em pacientes de risco (ambulatório de patologia do colo) e pacientes de baixo risco (ambulatório de ginecologia geral). À medida que o estudo foi se desenvolvendo, foi-se verificando a importância da frequência e das associações dessas DSTs com NIC.

Um dos grandes propósitos deste estudo foi avaliar a importância da inserção dessa PCR na prática clínica, visto o grande prejuízo que essas infecções causam às mulheres, como: infertilidade, gravidez ectópica, abortamentos, NIC e outros (ASHSHI *et al.*, 2015).

A TAB. 1 caracteriza as pacientes dos dois grupos quanto a idade, número de parceiros, tabagismo, início da vida sexual e método anticoncepcional. Não se constatou diferença significativa nessas variáveis, demonstrando que se trabalhou com dois grupos homogêneos.

Segundo Pinto, Túlio e Cruz (2002), mulheres tabagistas apresentam risco relativo três a sete vezes mais alto de desenvolver o câncer do colo do útero, porque o cigarro atua reduzindo a imunidade celular local, pela diminuição das células de Langhens, dos linfócitos e das imunoglobulinas, representando um importante cofator no aumento do risco desse câncer (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002). No presente estudo chama a atenção o baixo percentual de tabagistas, de 18,8%, entre as mulheres dos dois grupos, sem diferença significativa entre eles. Igansi *et al.* (2012), no Sul do Brasil, avaliando 1.217 pacientes assintomáticas quanto à frequência de clamídia e HPV, também verificaram apenas 26% de

tabagistas, salientando a tendência atual do comportamento das mulheres em relação ao cigarro.

Quando se iniciou o estudo, em relação à avaliação do método anticoncepcional utilizado pelas pacientes pensou-se em verificar associação das usuárias do dispositivo intrauterino (DIU) com as DSTs. Porém, em consequência ao baixo número de usuárias desse dispositivo, resolveu-se agrupar as pacientes em usuárias de método anticoncepcional hormonal *versus* não usuárias e usuárias de outros métodos. Os dois grupos foram homogêneos nessa análise.

Avaliando as características epidemiológicas das pacientes portadoras de NIC (n=33), nesta pesquisa 15 (26,3%) tinham mais de cinco parceiros. Almonte *et al.* (2011), ao analisar o comportamento sexual de mulheres britânicas, demonstraram que a prevalência e aquisição do HPV estão consistentemente relacionadas ao alto número de parceiros sexuais durante a vida e nos últimos cinco anos.

7.1 Teste de biologia molecular para HPV e DST

Os testes moleculares por PCR, com amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), representam a opção de primeira linha para diagnóstico e triagem das DSTs. As vantagens dessa metodologia não estão relacionadas apenas à alta especificidade e sensibilidade, mas também a identificar em um único exame vários agentes etiológicos. Neste trabalho foi usado o multiplex para cinco DSTs, porém existem possibilidades de fazer essas análises para maiores números de microrganismos. Choe *et al.* (2013), usando o PCR multiplex para sete agentes de DSTs em amostras de urina de 897 pacientes sintomáticas e assintomáticas, concluíram que o método tem alta sensibilidade e especificidade e, principalmente, possibilita rápido diagnóstico de várias DSTs simultaneamente.

Munson *et al.* (2015) usaram a RT-PCR para detectar clamídia, neisseria tricomonas e *Mycoplasma genitalium* em 2.478 amostras. Encontraram alto percentual de micoplasma e submeteram essas amostras a outro método de

detecção (*transcription-mediated amplification* - TMA), obtendo correspondência em 98,7%.

Kriesel *et al.* (2015) utilizaram um teste para detectar nove patógenos de DSTs, clamídia, neisseria, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, ureaplasma, *Haemophilus ducrey* e herpes-vírus tipo 1 e 2. Para tal, utilizaram amostras de diferentes sítios, tais como *swab* anal, *swab* uretral/cervical, urina e *swab* das úlceras de 295 pacientes. Compararam os resultados da RT-PCR com metodologias-padrão como Gram, cultura e *Enzyme Linked Immunosorbent assay* (ELISA), encontrando 98% de concordância para tricomonas e neisseria. Concluíram que esse teste tem potencial para melhorar atendimento em saúde pública, por apresentar alta sensibilidade, especificidade, rapidez e eficácia, possibilitando tratamento específico dessas doenças que causam tanto prejuízo à saúde das mulheres.

7.2 Frequência de DSTs

Todas as DSTs detectadas nesta investigação apresentaram alta frequência, visto que eram mulheres assintomáticas. Kharsany *et al.* (1993), num trabalho muito semelhante ao presente, registraram alta prevalência de HPV (46%), clamídia (21%), neisseria (5%) e gardenerela (39%), sugerindo que, independentemente de fazer parte ou não do grupo de risco, todas as mulheres devem ser rastreadas e tratadas para as DSTs. A frequência encontrada neste estudo foi semelhante, HPV: 46,8%; clamídia: 27,8%; e neisseria: 4,8%, reforçando a necessidade de rastreamento dessas DSTs. Nesta pesquisa, 66,6% das pacientes apresentavam alguma DST, sendo que algumas tinham duas, três e quatro patógenos, simultaneamente. Na TAB. 4, quando se avaliou em relação ao ambulatório de baixo e alto risco (grupos 1 e 2), a única variável significativa foi o HPV, que foi positivo em 69,5% das pacientes da propedêutica do colo. As outras DSTs não tiveram diferença significativa entre os grupos, achados similares aos de Kharsany *et al.* (1993).

Verteramo *et al.* (2009), pesquisando coinfeções em 857 pacientes, descreveram alta prevalência de HPV (31%), clamídia (8,05%) e coinfeção de HPV e clamídia (6,3%). Inferiram que todas as mulheres que frequentam serviços ginecológicos em uma comunidade em desenvolvimento devem ser avaliadas e tratadas para DSTs. No nosso estudo encontrou-se frequência ainda mais alta de HPV (46,8%), clamídia (27,8%) e coinfeção por HPV e clamídia (15%).

A RT-PCR foi usada para detectar clamídia, neisseria tricomonas e *Mycoplasma genitalium* em 2.478 amostras. Encontraram frequência de *Mycoplasma genitalium* de 11,4%, clamídia 6,2% e neisseria 1,4% (MUNSON *et al.*, 2015). 566 (22,8%) pacientes apresentaram pelo menos uma DST.

Em relação à clamídia, a frequência aqui encontrada foi de 27,8%, valor maior que o registrado na literatura. Em geral, os países em desenvolvimento têm maior prevalência da infecção por CT (FRANCESCHI *et al.*, 2006). Alguns autores relataram valores de prevalência que variam de 5-22% para CT, mas podem chegar a 41% entre adolescente do sexo feminino (DELUCA *et al.*, 2011; WHO, 2012). Por outro lado, em países desenvolvidos, a prevalência para CT tem níveis que variam de 2 a 10% na população em geral e de 5 a 20% em adolescentes do sexo feminino (FERDÁNDEZ-BENÍTEZ *et al.*, 2013; WHO, 2012).

A avaliação por metanálise de estudos epidemiológicos realizados na Espanha com mulheres sexualmente ativas e assintomáticas informou prevalência que variou de 3,1-10% (FERNÁNDEZ-BENÍTEZ *et al.*, 2013). Outro trabalho, também de metanálise, que reuniu 76 estudos de prevalência da CT na Austrália, demonstrou prevalência de 10,2% para mulheres (LEWIS *et al.*, 2012). No Brasil, em geral, as prevalências variam de 12,2 a 20,7%. Em pesquisa feita em Porto Alegre, também com mulheres assintomáticas, constatou-se prevalência de 12,2% (RAMOS; BECKER; GERMANY, 2003). Já em Manaus, Santos *et al.* (2003) acompanharam 121 mulheres, encontrando a prevalência da infecção pela CT de 20,7%.

Devido à grande importância de doenças causadas pela CT e aos riscos associados à sua infecção, o CDC (2006) preconiza o rastreamento de rotina

para CT em gestantes e em todas as mulheres sexualmente ativas entre 15 e 25 anos de idade. Porém, ainda poucos países realizam rotineiramente o rastreamento da infecção por CT. Observa-se que países que adotaram o rastreio de rotina obtiveram resultados satisfatórios e demonstram que esse rastreamento pode ser custo-efetivo, mesmo quando as prevalências da infecção são baixas (AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY - AHRQ, 2007; HONEY *et al.*, 2002; NATIONAL CHLAMYDIA SCREENING STEERING GROUP – NCSSG, 2006). Nosso estudo encontrou alta frequência de CT em mulheres assintomáticas e corrobora a sugestão de rastreamento.

Apurou-se alta frequência de *Mycoplasma genitalium*, 28,6% quando comparado com a literatura. Em estudos que relatam a detecção por meio da PCR convencional, Falk, Fredlund e Jensen (2005) e Walker *et al.* (2011) relataram a frequência de 2,4% e 6%, respectivamente. No Brasil, Rodrigues *et al.* (2011), também com uso da PCR convencional, obtiveram a frequência de 0,9%. Munson *et al.* (2015), analisando 2.478 amostras cervicais por PCR multiplex para clamídia, tricomonas, *Mycoplasma genitalium* e neisseria, referiram a maior prevalência de *Mycoplasma genitalium*: 11,4%. Da mesma maneira, Andersen *et al.* (2007), com uso da RT-PCR, reportaram frequência de 2,3% nas amostras de swab genital testadas.

Segundo Falk, Fredlund e Jensen (2005), os valores de prevalência podem variar de 0 a 42%. A revisão do tema realizada por Sethi *et al.* (2012) acusa variação de 4 a 42% em vários estudos no mundo. Essa variação pode ser explicada por diversos fatores que incluem o ambiente clínico, a especificidade do ensaio empregado, critérios de seleção dos participantes (ex. sinais e sintomas específicos), localização geográfica do estudo, comportamentos de risco (ex. profissionais do sexo) e coinfeção por outra DST. Por esse motivo, a transmissão sexual e a prevalência variável de *Mycoplasma genitalium* mundialmente constituem fator de importância na saúde pública, sobretudo em locais em que não é conhecido o perfil da população afetada. Sugere-se que se inclua a pesquisa rotineira dessa DST considerando o prejuízo para a saúde das mulheres e sua alta prevalência em mulheres assintomáticas.

A frequência de *Mycoplasma hominis* foi de 0,8%, valor menor do que o citado por outros autores. Em estudo no Sul do Brasil, Avelar *et al.* (2007) observaram frequência de 4,8%. Mais recentemente, na região Sudeste do país, Rodrigues *et al.* (2011) detectaram *Mycoplasma hominis* em 21,9% das amostras de swab cervical testadas. Jombo e Enenebeaku (2008) e Doh *et al.* (2004) relataram detecção de 12,1 e 16,5%, respectivamente. Poucos estudos abordam a detecção de *Mycoplasma hominis* por meio da RT-PCR. Contudo, foram encontradas porcentagens variando de 2,4 a 14% (BACZYNSKA *et al.*, 2004; CUNNINGHAM *et al.*, 2013).

Neisseria gonorrhoeae foi constatada em 4,8% das mulheres analisadas, valor semelhante ao encontrado na literatura. Casin *et al.* (2002), Huppert *et al.* (2008) e Manhart, Critchlow e Holmes (2003) reportam frequências desse agente variando de 3,0 a 12%. O trabalho realizado por Rodrigues *et al.* (2011), em Minas Gerais, sublinhou 4% de prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* em 224 pacientes atendidas em clínica de atendimento primário. Em São Paulo, Luppi *et al.* (2011) documentaram, em uma população de 781 pacientes de um centro de atendimento primário, 1,9% de prevalência. Por outro lado, o Ministério da Saúde, em estudo multicêntrico, encontrou prevalência de 1,5% de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* em amostra de 2.913 gestantes (BRASIL, 2008). Usando a mesma metodologia, Kriesel *et al.* (2015) apuraram prevalência de 7% em 295 pacientes assintomáticas nos EUA.

Ureaplasma foi encontrado em 4,8% das pacientes. Kriesel *et al.* (2015) informaram prevalência de 12% em 295 pacientes assintomáticas nos EUA, usando a mesma metodologia do nosso estudo.

Na população feminina geral, a infecção pelo HPV varia de 2 a 44%, segundo Trotier *et al.* (2006). No Brasil, esses índices são ainda mais altos. Segundo Fernandes *et al.* (2009), a incidência na população geral varia de 21 a 48%, sendo frequente a infecção por múltiplos tipos de HPV. A frequência encontrada nesta pesquisa foi de 46,8%, condizendo, então, com os dados da literatura.

7.3 Associação das DSTs com NIC

Sabe-se que o HPV é um dos fatores mais importantes e necessários para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. No entanto, a ação de fatores de risco juntamente com o vírus HPV é determinante na carcinogênese. Diversos estudos têm demonstrado que fatores como o hábito de fumar, a multiparidade, o uso prolongado de anticoncepcional e infecções por outras DSTs podem triplicar o risco do desenvolvimento de lesões pré-malignas ou até mesmo de câncer entre mulheres infectadas com tipos oncogênicos de HPV (LU *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2002).

Muñoz *et al.* (2006) destacam três grupos de potenciais cofatores na carcinogênese cervical: os ambientais, os virais (infecções por tipo de HPV específico, coinfeções por tipos de HPV diferentes, carga viral, variantes do HPV e integração viral) e os do hospedeiro (fatores genéticos, hormônios endógenos e outros relacionados à resposta imune). Porém, o papel que cada um deles desempenha na carcinogênese ainda é desconhecido.

Vários estudos vêm ressaltando a importância de outras DSTs como cofatores para a permanência do HPV e desenvolvimento de NIC (BARROS *et al.*, 2012; DE LIMA; ALVES, 2009; SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

Acredita-se que a infecção por outras DSTs pode impedir a resolução da infecção por HPV, a partir da indução de um padrão de resposta imune inata e adquirida, em especial a imunidade humoral (DE LIMA; ALVES, 2009). As células epiteliais exercem importante papel na indução de resposta imune inata no trato genital feminino (QUAYLE, 2002). Essas células que recobrem as superfícies mucosas não atuam apenas como barreira física, mas também participam ativamente da secreção de substâncias antimicrobianas e fatores imunes como defensina, lactoferrina e lisozima. A zona de transformação é o provável sítio inicial de infecções, como as causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), pelo papilomavírus humano (HPV) e as infecções bacterianas, como a infecção por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e outros (SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos encontrados mostra a associação da clamídia com o HPV., Barros *et al.* (2012), avaliando a associação de HPV e clamídia em 131 pacientes brasileiras com câncer de colo uterino, encontrou 31 casos (27,4%) de coinfeção por clamídia e HPV. Tamim *et al.* (2002), analisando 129 pacientes, constatou maior frequência de pacientes infectadas por clamídia no grupo de pacientes HPV-positivo (29/49), sugerindo, assim, que a infecção por clamídia pode funcionar como cofator ao HPV para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical.

Neste estudo, a coinfeção de HPV e clamídia em 19 pacientes atingiu 15,0% ($p=0,023$). Smith *et al.* (2002), em análise baseada em dois estudos do tipo caso-controle envolvendo 499 mulheres com câncer cervical e 539 controles no Brasil e Filipinas, demonstraram que entre mulheres HPV-positivo a positividade para clamídia *trachomatis* revela risco duas vezes maior de desenvolvimento do câncer cervical do que entre mulheres HPV-negativo (OR=2,1, 95% IC: 1,1-4,0) e destacam o fato de que infecções por CT podem induzir metaplasia imatura e tanto o HPV quanto a CT podem infectar o tecido metaplásico, onde surge a neoplasia cervical. Assim sendo, infecção crônica dessa bactéria em conjunto com o HPV pode ser um dos fatores de risco mais relevantes na mediação do câncer cervical.

Para Magalhães *et al.* (2012), em um estudo transversal de 1.134 amostras cervicais de mulheres brasileiras do Sul do Brasil, comparando resultados da coinfeção aos resultados citológicos, verificou associação da coinfeção HPV-CT com alterações citológicas em mulheres jovens com múltiplos parceiros. Bellaminutt *et al.* (2014), em mulheres de região de risco para câncer de colo na Itália, notificou 17% de coinfeção, sugerindo o rastreamento para clamídia e tratamento em mulheres jovens.

Verificando a associação da coinfeção HPV-CT em pacientes de ambulatório de colposcopia, Barros *et al.* (2012) encontraram prevalência de 26% de clamídia e 27,4% de coinfeção, com associação da coinfeção com NIC II/III.

Em relação à infecção por clamídia, das 35 pacientes positivas para essa bactéria, 15 (42,9%) tinham NIC, enquanto das 91 das pacientes soronegativas, 73 (80%) não tinham NIC ($p=0,009$). A infecção por clamídia está associada a alterações do epitélio cervical, fornecendo ambiente favorável para a progressão da infecção pelo HPV e o desenvolvimento de NIC e câncer cervical (SILVA; CERQUEIRA; MEDEIROS, 2014).

O efeito da CT no epitélio cervical pode ser assim definido: funciona como porta de entrada, permitindo o acesso do HPV à camada basal do epitélio; aumenta a carga viral do HPV; interage com os tipos de HPV de alto risco; e modula a resposta imune do hospedeiro, inibindo o processo de apoptose (PABA *et al.*, 2008). Na inflamação crônica por CT, têm-se a diminuição das células apresentadoras de antígeno no trato genital inferior e a inibição da imunidade celular e da capacidade antiapoptótica, podendo influenciar a história natural da infecção pelo HPV, ou seja, a progressão e a persistência do vírus.

Embora diversos estudos indiquem associação positiva envolvendo CT e lesões neoplásicas cervicais, o papel específico dessa bactéria na patogênese da neoplasia cervical ainda não foi completamente elucidado (SILVA; CERQUEIRA; MEDEIROS, 2014). Entende-se que a interação HPV-CT esteja frequentemente associada à NIC. Em nossa casuística, na análise univariada a coinfeção HPV-CT foi significativa ($p=0,023$), porém após análise multivariada essa associação não foi comprovada, provavelmente em decorrência do pequeno número de pacientes avaliadas.

O papel da clamídia no processo multifásico da carcinogênese cervical e na infecção pelo HPV ainda não está totalmente esclarecido. Isso destaca a importância da prevenção das infecções por clamídia e HPV, com o objetivo de reduzir as taxas de NIC, de câncer do colo do útero e de complicações ginecológicas relacionadas à CT em mulheres na idade reprodutiva.

Muito tem se discutido a respeito da associação do ureaplasma com as lesões cervicais. Verteramo *et al.* (2009) realçaram a elevada associação entre *Ureaplasma urealyticum* e a infecção por HPV em pacientes com lesões

cervicais. Lukic *et al.* (2006) analisaram 239 mulheres com anormalidades no exame citológico. *Ureaplasma urealyticum* foi detectado em 27% com diagnóstico para ASCUS, 35% para LSIL e 45% for HSIL, contra 19% para o grupo-controle. Evidenciou-se a elevada associação entre as infecções por *Ureaplasma urealyticum* e HPV. A presente pesquisa não reconheceu significância na associação de ureaplasma com NIC ($p=0,155$), provavelmente pelo pequeno número de pacientes avaliadas.

Em relação ao *Mycoplasma genitalium*, 38,9% das pacientes com NIC eram positivas ($p=0,040$). Não se encontraram estudos sobre a associação desse patógeno com a infecção pelo HPV e NIC. A associação do *Mycoplasma genitalium* com NIC ainda não está estabelecida na literatura, visto que essa DST passou a ser investigada após a prática de PCR para múltiplos patógenos e porque na grande maioria dos casos os estudos mostram a importância da associação de várias DSTs com NIC, sendo difícil avaliar isoladamente a atuação do *Mycoplasma genitalium* (ANAGRIUS; LORE; JENSEN, 2005; HUPPERT *et al.*, 2008; TOSH *et al.*, 2007).

Alguns autores associam essa DST à cervicite. Mobley *et al.* (2012), avaliando 381 mulheres, depararam com 19,2% de *Mycoplasma genitalium*, 6,0% de clamídia e 19,8% de coinfeção entre clamídia e micoplasma. Analisaram isoladamente a infecção pelo *Mycoplasma genitalium* e acusaram relação significativa com cervicite ($p=0,03$). Lusk *et al.* (2011), a respeito da associação de *mollicutes* com cervicite e HIV em uma população australiana, pesquisaram 527 mulheres e perceberam frequência de 4,0% de *Mycoplasma genitalium* e associação importante desse patógeno com cervicite e infecção por HIV.

No nosso estudo, 59 pacientes (64,4%) eram portadoras do HPV e não apresentavam lesão intraepitelial cervical. Nelas, o HPV provavelmente se encontrava em estado de latência, sem manifestar sintomas clínicos e subclínicos, sendo identificado apenas por biologia molecular. O HPV tem, como forma de sobrevivência, a capacidade de produzir infecção crônica, e não despertar grandes respostas imunológicas. A infecção restringe-se à junção escamocolumnar e não há viremia, ficando o vírus escondido do sistema imune, até

que ocorra o *clearance* ou mais replicação viral, alterando a camada basal do epitélio (NIC I) ou ativação das oncoproteínas para integração do vírus ao DNA do hospedeiro (NIC II/III) (SONG *et al.*, 2015).

Em 12 pacientes com NIC o PCR para HPV foi negativo, provavelmente caracterizando resultados falso-negativos do PCR. Como citado anteriormente, a PCR, apesar de seu valor inquestionável e de sua alta sensibilidade, pode ter resultados falso-negativos devido a vários fatores, como: quantidade insuficiente de vírus na amostra (MUÑOZ *et al.*, 2003; QUEIROZ, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2000; SILVA, 2004; YOKOYAMA *et al.*, 2003), qualidade da amostra do DNA que sofre influência dos efeitos de agentes desnaturantes, do tempo e condições de estocagem, assim como a qualidade dos *primers* e o tipo de enzima polimerase usados (DO CARMO; FIORINI, 2007; IFTNER; VILLA, 2003; MELO *et al.*, 2005; NONOGAKI *et al.*, 2004).

Após análise multivariada, concluiu-se que a infecção por clamídia e a infecção por HPV estão associadas à neoplasia intraepitelial cervical.

8 COMENTÁRIOS FINAIS

Ao iniciar este estudo, o maior interesse era trabalhar com uma técnica de biologia molecular por PCR multiplex para várias DSTs e verificar a frequência dessas infecções em pacientes de risco (propedêutica do colo) e pacientes de baixo risco (ambatório de ginecologia geral). O objetivo era discutir a implementação desse exame na prática clínica.

Baseado nos dados da literatura, esperava-se frequência menor das DSTs e associação da coinfeção HPV-CT à NIC. Foi surpresa a alta frequência de clamídia, *Mycoplasma genitalium*, neisseria e ureaplasma em mulheres assintomáticas. Em relação às coinfeções, reconhece-se que o nosso número de pacientes foi reduzido para verificar essa associação.

A infecção por *Mycoplasma genitalium* é descrita como uma DST emergente, estando relacionada a uretrite, cervicite e salpingite, mas ainda não existem estudos suficientes na literatura para verificar sua associação com NIC.

Acredita-se que o mecanismo de ação dessas infecções sexualmente transmissíveis relacionadas à NIC seria o mesmo da clamídia: processo inflamatório com interferência na imunidade local, favorecendo desde a entrada do HPV até sua persistência e progressão.

Considerando que as DSTs avaliadas neste estudo estão associadas a vários agravos à saúde da mulher, tais como cervicites, uretrites, doença inflamatória pélvica, endometriose e infertilidade, justifica-se mais preocupação das autoridades de saúde, no sentido de definir e implementar políticas públicas voltadas para o diagnóstico e tratamento precoce dessas infecções.

É de grande importância que este trabalho tenha destaque na divulgação da RT-PCR multiplex para os ginecologistas, estimulando a inserção deste exame na prática clínica.

9 CONCLUSÕES

- a) A frequência das DSTs (HPV, clamídia, neisseria, *Mycoplasma genitalium* e ureaplasma) foi alta em pacientes assintomáticas.
- b) Os fatores de risco para NIC foram: infecção por HPV, clamídia, *Mycoplasma genitalium*, coinfeção por HPV e clamídia e a infecção por HPV associada a pelo menos uma DST.
- c) A infecção por HPV e por clamídia está associada à neoplasia intraepitelial cervical.
- d) A alta frequência das DSTs em mulheres assintomáticas reforça a necessidade do rastreamento dessas infecções.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY. AHRQ. **Screening for Chlamydial Infection**: Clinical Summary of US Preventive Services Task Force. Rockville, 2007. Disponível em: <http://www.ahrq.gov/clinic/uspstf07/chlamydia/chalcsu.htm>. Acesso em: 30 de dezembro de 2012.

AIDÉ, S. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia. **DST J Bras Doenças Sex Transm**, v. 21, n. 4, 2009.

ALMONTE, M. *et al.* Sexual behavior and HPV infection in British women by postal questionnaires and telephone interviews. **J Med Virol**, v. 83, p. 1238-1246, 2011.

ANAGRIUS, C.; LORE, B.; JENSEN, J.S. Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission. **Sex Transm Infect**, v. 81, n. 6, p. 458-62, 2005.

ANDERSEN, B. *et al.* Mycoplasma genitalium: prevalence and behavioural risk factors in the general population. **Sex Transm Infect**, v. 83, n. 3, p. 237-41, 2007.

ASHSHI, A.M. *et al.* Prevalence of 7 sexually transmitted organisms by multiplex real-time PCR in Fallopian tube specimens collected from Saudi women with and without ectopic pregnancy. **BMC Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 569, Dec. 2015.

AVELAR, G.S. *et al.* *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. em amostras do trato genitourinário e sua relação com sintomas de infecção genital. **Rev Bras Anal Clin**, v. 39, n. 4, p. 295-298, 2007.

AZULAY, R.D.; AZULAY, M.M. Doenças sexualmente transmissíveis. *In: Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 467-88.

BACZYNSKA, A. *et al.* Development of real-time PCR for detection of Mycoplasma hominis. **BMC Microbiology**, v. 4, n. 35, p. 1-13, 2004.

BAKEN, K.B.; HAAGENSEN, J.A.J.; TOLKER-NIELSEN, T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. **Clin Chim Acta**, v. 384, p. 1-11, 2007.

BARROS, N.K.S. *et al.* Association of HPV infection and Chlamydia trachomatis seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. **J Med Virol**, v. 84, n. 7, p. 1143-50, 2012.

BASEMAN, J.B. *et al.* Interplay between mycoplasmas and host target cells. **Microb Pathog**, v. 19, p. 105-116, 1995.

BASEMAN, J.B.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol**, Suppl 1, p. S16-S24, Mar. 2005.

BÉBÉAR, C.; BARBEYRAC, B. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, p. 4-10, 2009.

BELLAMINUTTI, S. *et al.* HPV and Chlamydia trachomatis co-detection in young asymptomatic women from high incidence area for cervical cancer. **J Med Virol**, v. 86, n. 11, p. 1920-5, Nov. 2014.

BERGEY'S. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. *In*:

BERGEY'S. **Manual of systematic bacteriology**. 2. ed., New York: Springer-Verlag, v. 4, 2010. 721 p.

BIGIO, C.T.; BARBOSA, F.A.; CAVALCANTI, S.M.B. Detecção e tipagem viral para papilomavírus humanos: progressos recentes e perspectivas clínicas. **DST J Bras Sex Transm**, v. 14, n. 4, p. 32-35, 2002.

BLACK, M.C. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. **Clin Microbiol Reviews**, v. 1, p. 160-184, 1997.

BOSCH, F.X.; SANJOSE, S. Human Papillomavirus and cervical cancer burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 31, p. 3-13, 2003.

BOVE, J.M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumoniae microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. **Res Microbiol**, v. 150, p. 239-45, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias**: Guia de bolso, 6. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, p. 149-151.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro, RJ. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Taxas de prevalência de gonorreia em mulheres brasileiras relatadas na literatura científica**. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: www.saude.gov.br. Acesso em: 15/05/2008.

BROWN, D.R.; WHITCOMB, R.F.; BRADBURY, J.M. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). **Int J System Evolut Microbiol**, v. 57 (Pt 11), p. 2703-2719, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64722-0>. Acesso em: janeiro 2016.

CASIN, I. *et al.* High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. **Sex Transm Dis**, v. 29, n. 6, p. 353-359, 2002.

CASSELL, G.H. *et al.* Ureaplasma urealyticum intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 1, p. 69-87, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Increases in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* - Hawaii and California, 2001. **MMWR**, v. 51, p. 1041-4, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. **Report to Congress**: Prevention of Genital Human papillomavirus Infection. Department of Health and Human Services: [s.l.], 2004.

CENTER OF DISEASES CONTROL AND PREVENTION. CDC. Screening test to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. **MMWR**, v. 51, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Std Content Updated. **Gonorrhea**, Dec. 2007. Disponível em: www.cdc.gov/std/Gonorrhea/STDFact-gonorrhea.htm. Acesso em: 15/05/2008.

CHOE, H.S. *et al.* Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. **Int J Infect Dis**, v. 17, n. 12, p. e1134-40, Dec. 2013. doi: 10.1016/j.ijid.2013.07.011. Epub 2013 Sep 7.

CUNNINGHAM, S.A. *et al.* Rapid PCR Detection of mycoplasma hominis, ureaplasma urealyticum, and ureaplasma parvum. **Int J Bacteriol**, v. 2013, 2013.

DE LIMA, Yanna Andressa Ramos; ALVES, Maria de Fátima Costa. O sistema imune da mucosa do trato genital feminino e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis. **Rev Patol Trop**, v. 37, n. 4, p. 295-310, 2009.

DELUCA, G.D. *et al.* Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. **Br J Infect Dis**, v. 15, n. 6, p. 567-572, 2011.

DE VILLIERS, E.M. *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DICLEMENTE, R.J. *et al.* Prevalence, correlates and efficacy of selective avoidance as a sexually transmitted disease prevention strategy among African American adolescent females. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 162, n. 1, p. 60-5, Jan. 2008.

DO CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus humano. **Rev Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2007.

DE RODA HUSMAN, Ana-Maria *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 4, p. 1057-1062, 1995.

DOH, K. *et al.* Differential vaginal expression of interleukin-1 system cytokines in the presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 12, p. 79-85, 2004.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, v. 32, Suppl 1, p. S7-15, mar. 2005.

DORES, G.B. *et al.* Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV-induzidas e do câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. **NewsLab**, v. 35, p. 196-205, 1999.

FALK, L.; FREDLUND, H.; JENSEN, J. S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. **Sex Transm Infect**, v. 81, p. 73-78, 2005.

FARENCEA, A. *et al.* Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. **Infect Immun**, v. 65, n. 7, p. 2965-2969, Jul. 1997.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5201-7, 11 Ago. 2003.

FERNANDES, J.V. *et al.* Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 105, n. 1, p. 21-4, 2009.

FERNÁNDEZ-BENÍTEZ, C. *et al.* Chlamydial Primary Care Group. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 388, p. 18, 2013.

FISCHER, N. *Chlamydia trachomatis* infection in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 23, n. 3, p. 247-250. 2002.

FORTENBERRY, J.D. *et al.* Subsequent sexually transmitted infections among adolescent women with genital infection due to *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, or *Trichomonas vaginalis*. **Sex Transm Dis**, v. 26, p. 26-32, 1999.

FRANCESCHI, S. *et al.* IARC Prevalence Surveys Study Group. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **Int J Cancer**, v. 119, p. 2677-2684, 2006.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 e E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **J Biosci**, v. 34, n. 1, p. 113-23, Mar., 2009.

GIRDNER, J. *et al.* Evaluation of the digene hybrid capture II test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 1579-1581, May 1999.

GHITTONI, R. *et al.* The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus genes**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2010.

GLASS, J.I. *et al.* The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 757-762, 2000.

GOLIJOW, C.D. *et al.* Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections cervical disease in Argentine women. **Gynecol Oncol**, v. 96, p. 181-186, 2005.

GRAY-SWAIN, M.R.; PEIPERT, J.F. Pelvic inflammatory disease in adolescents. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n. 5, p. 503-10, 2006.

HARADA, K. *et al.* Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. **Microbiol Immunol**, v. 52, n. 6, p. 297-304, 2008.

HONEY, E. *et al.* Cost effectiveness for screening for Chlamydia trachomatis: a review of published studies. **Sex Transm Infect**, v. 78, p. 406-412, 2002.

HUPPERT, J.S. *et al.* *Mycoplasma genitalium* detected by transcription-mediated amplification is associated with *Chlamydia trachomatis* in adolescent women. **Sex Transm Dis**, v. 35, n. 3, p. 250-254, 2008.

IFTNER, T.; VILLA, L.L. Human papillomavirus technologies. **J Nat Cancer Inst Monogr**, USA, n. 31, 2003.

IGANSI, C.N. *et al.* HPV and Chlamydia trachomatis genital infection among non-symptomatic women: prevalence, associated factors and relationship with cervical lesions **Cad Saude Colet**, v. 20, pp. 287-296, 2012.

JALAL, H. *et al.* Development and validation of a rotor-gene real time-PCR assay for detection, identification and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 206-13, 2006.

JALAL, H. *et al.* Development of real time-PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2649-53, 2007.

JENSEN, J.S.; BLOM, J.; LIND, K. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. **Int J Exp Pathol**, v. 75, p. 91-98, 1994.

JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. **JEADV**. v. 18, p. 1–11, 2004.

JENSEN, K.E. *et al.* Women's sexual behavior. Population based study among 65.000 women from four Nordic countries before introduction of human papillomavirus vaccination. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 90, n. 5, p. 459-467, 2011.

JOMBO, G.T.; ENENEBEAKU, M.N. Genital mycoplasma infections among women in an urban community of northern Nigeria: do we need to search for them? **Niger J Med**, v. 17, n. 3, p. 310-6, 2008.

KHARSANY, A.B. *et al.* The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. **Genitourinary Med**, v. 69, n. 5, p. 357-360, 1993.

KRIESEL, J.D. *et al.* Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted diseases. **Int J STD & AIDS**, p. 0956462415615775, 2015.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins**: patologia básica. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LEWIS, D. *et al.* The prevalence of Chlamydia trachomatis infection in Australia: a systematic review and metaanalysis. **BMC Infect Dis**, v. 12, n. 113, p. 1-18, 2012.

LU, B. *et al.* Factors associated with acquisition and clearance of human papillomavirus infection in a cohort of US men: a prospective study. **J Infect Dis**, v. 199, n. 3, p. 362-371, 2009.

LUKIC, A. *et al.* Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: the role of Ureaplasma urealyticum. **Anticancer Res**, v. 26, n. 6C, p. 4843-4849, 2006.

LUPPI, C.G. *et al.* Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. **Rev Bras Epidemiol**, v. 14, n. 3, p. 467-77, 2011.

LUSK, M.J. *et al.* Mycoplasma genitalium is associated with cervicitis and HIV infection in an urban Australian STI clinic population. **Sexy Transm infect**, v. 87, n. 2, p. 107-109, 2011.

MAGALHÃES, P.A. *et al.* Association of HPV infection and Chlamydia trachomatis seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. **J Med Virol**, v. 84, n. 7, p. 1143-50, Jul. 2012. doi: 10.1002/jmv.23312.

MAHONY, J. *et al.* Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in first-void urine specimens by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Mol Diag**, v. 2, n. 3, p. 161-68, 1997.

MAHONY, J. *et al.* Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genitourinary specimens. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 11, p. 3049-3053, 1995.

MANHART, L.E. *et al.* Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. **J Infect Dis**, v. 187, n. 4, p. 650-657, 2003.

MANHONY, J.B.; COOMBES, B.K.; CHERNESKY, M.A. Chlamydia and Chlamydophila. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed., Washington DC: ASM Press 2003, p. 991-1004.

MARSHALL, R. *et al.* Characteristics of the m2000 automated sample preparation and Multiplex Real Time-PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 747-751, 2007.

MARTIN, H.L. *et al.* Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type I and sexually transmitted disease acquisition. **J Infect Dis**, v. 180, p. 1863-1868, 1999.

MELO, A. *et al.* Detection of human papillomavirus in cytologic samples or biopsies of the cervix. **Rev Med Chile**, v. 133, p. 639-644, 2005.

MIYASHITA, N. *et al.* The 7,5-Kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. **J Infec Chemother**, v. 7, n. 2, p. 113-116, Jun. 2001.

MOBLEY, V.L. *et al.* Mycoplasma genitalium infection in women attending na STI clinic: diagnostic specimen type, co-infections, and predictors. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 9, p. 706-709, 2012.

MOLIJN, A. *et al.* Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J Clin Virol**, v. 32, Suppl. 1, p. S43-S51, 2005.

MORENO, V. *et al.* Effect of oral contraceptives on risk of cervical câncer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, n. 30, p. 1085-1092, 2002.

MORTOZA JÚNIOR, G. Neoplasia intraepitelial cervical. *In*: MORTOZA JÚNIOR, G. **Patologia cervical: da teoria à prática clínica**. Rio de Janeiro: Med Book, 2006.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The N Eng J Med**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MUNOZ, N. *et al.* HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1-S10, 2006.

MUNSON, E. *et al.* Clinical laboratory assessment of mycoplasma genitalium trancription-mediated amplification using primary female urogenital specimes. **J Clin Microbiol pii JCM**, p. 02463-15, 2015.

NATIONAL CHLAMYDIA SCREENING STEERING GROUP. NCSSG. **New Frontiers**: Annual report of the National Chlamydia Screening, 2006.

NONOGAKI, S. *et al.* Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identitying HPV infections in samples collected in a new collection medium. **Acta Cytologica**, v. 48, p. 514-520, 2004.

OSTÖR, A.G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol**: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists, v. 12, n. 2, p. 186-92, Apr. 1993.

PABA, P. *et al.* Co-expression of HSV2 and *Chlamydia trachomatis* in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. **Intervirol**, v. 51, n. 4, p. 230-234, 2008.

PASSOS, M.R.L. **DST 5: doenças sexualmente transmissíveis (Dessetologia)**. 5. ed., Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005, p. 225-233.

PEREYRE, S. *et al.* Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. **J Antimicrob Chemothe**, v. 57, p. 753-756, 2006.

PINTO, Á.P.; TULIO, S.; CRUZ, O.R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 1, p. 73-8, 2002.

QUAYLE, A.J. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. **J Reprod Immunol**, v. 57, n. 1, p. 61-79, 2002.

QUEIROZ, J.C.M.P. **Expressão de proteínas do ciclo celular e de moléculas de adesão na carcinogênese cervical**. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, 2003. 128 p.

RAMA, C. *et al.* Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 3, São Paulo, Jun., 2008

RAMÍREZ-SALAZAR, E. *et al.* HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. **Virology J**, v. 8, n. 1, p. 1, 2011.

RAMOS, M.C.; BECKER, D.; GERMANY, C. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela reação em cadeia da polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 15, n. 2, p. 12, 2003.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 4, p. 1094-156, 1998.

REDDY, S.P.; RASMUSSEN, W.G.; BASEMAN, J.B. Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 15, p. 199-211, 1996.

ROBERTSON, J.A. *et al.* Human ureaplasmas show diverse genome sizes by pulsed-field electrophoresis. **Nucleic Acids Res**, v. 18, n. 6, p. 1451-1455, 1990.

RODRIGUES, A.D. *et al.* Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 6, Rio de Janeiro, dez. 2009.

RODRIGUES, M.M. *et al.* Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. **J Obstet Gynaecol**, v. 31, n. 3, p. 237-41. 2011.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol Rev**, v. 83, p. 417-432, 2003.

RICHART, R.M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathology annual**, v. 8, p. 301, 1973.

SAAVEDRA, K. P.; BREBI, P. M.; ROA, J. C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. **Clin Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 13, 2012.

SAMOFF, E. *et al.* Association of *Chlamydia trachomatis* with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. **Am J Epidemiol**, v. 162, n. 7, p. 668-675. 2005.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-921, 1994.

SANTOS, C. *et al.* Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. **BR J Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 91-95, 2003.

SCHACHTER, J.; STAMM, E.W. *Chlamydia trachomatis*. In: MURRAY, P.R. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 6. ed., Washington, D.C., ASM Press, 1999, p. 669-677.

SCHIFFMAN, M.H. *et al.* HPV DNA testing in cervical cancer screening results from women in a high-risk province of Costa Rica. **J Am Med Assoc**, v. 283, p. 87-93, 2000.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007.

SCHLECHT, N.F. *et al.* Human papillomaviruses infection and time to progression of cervical intraepithelial neoplasia. **J Nat Cancer Inst**, v. 95, n. 17, p. 1336-1343, 2003.

SCHLICHT, M.J. *et al.* High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin.

J Clin Microbiol, v. 42, n. 10, p. 4636-40, 2004.

SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A.B. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, p. 209-220, 2001.

SEADI, C.F.; ORAVEC, R.; ROSSETTI, M.L. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 38, n. 2, p. 125-133, 2002.

SETHI, S. *et al.* *Mycoplasma genitalium*: An emerging sexually transmitted pathogen. **Indian J Med Res**, v. 136, n. 6, p. 942-955, 2012.

SHEPARD, M.C. *et al.* *Ureaplasma urealyticum* gen nov, sp nov: Proposed Nomenclature for the Human T (T-Strain). **Mycoplasmas**, v. 24, n. 2, p. 160-171, 1974. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/content/24/2/160.abstract>>. Acesso em: janeiro de 2016.

SHIPITSYNA, E. *et al.* Comparison of microscopy, culture and in-house PCR and NASBA assays for diagnoses of *Neisseria gonorrhoeae* in Russia. **APMIS**, v. 116, n. 2, p. 133-8, Feb. 2008.

SILVA, J.; CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, R. *Chlamydia trachomatis* infection: implications for HPV status and cervical cancer. **Arch Gynecol Obstet**, v. 289, n. 4, p. 715-723. 2014

SILVA, T.T. **Fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical em pacientes submetidas à avaliação morfológica e pesquisa de DNA-HPV.** (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SMITH, J.S. *et al.* *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **Int J Cancer**, v. 111, p. 431-439, 2004.

SMITH, J.S. *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. **J Infect Dis**, v. 185, n. 3, p. 324-331, Feb. 2002.

SONG, D. *et al.* Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. **Oncology Letters**, v. 10, n. 2, p. 600-6, 2015.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D.C. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev Bras Cancerol**, v. 51, n. 2, p.155-160, 2005.

STAMM, W.E.; JONES, R.B.; BATTEIGER, B.E. Chlamydial diseases. *In*: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Editors). **Principles and practice**

of infectious diseases. 6. ed., USA: NewYork: Elsevier Churchill Livingstone, v. 2, n. Pt3, p. 2236-2255, 2005.

STEPHENS, R.S. *et al.* Genome sequence of an obligate intracellular pathogens of humans: Chlamydia trachomatis. **Science**, v. 282, n. 5389, p. 754-759, Oct. 1998.

TAMIM, H. *et al.* Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, v. 43, p. 277-281, 2002.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mycoplasma genitalium: an up-date. **Int J STD AIDS**, v. 13, p. 145-151, 2002.

THOMAS, N.S. *et al.* Plasmid diversity in Chlamydia. **Microbiology**, v. 143, n. Pt6, p. 1847-1854, Jun. 1997.

TOSH, A.K. *et al.* Mycoplasma genitalium among adolescent women and their partners. **J Adolesc Health**, v. 40, n. 5, p. 412-7, 2007.

TROTIER, H. *et al.* Human papillomaviruses infection with multiple types and risk of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol, Biomark Prev**, v. 15, n. 7, p. 1274-1280, July 2006.

TUON, F.F.B. *et al.* Avaliação da sensibilidade e especificidade dos exames citopatológico e colposcópico em relação ao exame histológico na identificação de lesões intra-epiteliais cervicais. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 2, p. 140-144, 2002.

VAN DER, P.B. *et al.* Evaluation of the digene hybrid capture II assay with the rapid capture system for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 10, p. 3558-3364, Oct. 2002.

VAN DOORNUM, G.J.J. *et al.* Comparison between the LCx Probe System and the COBAS AMPLICOR System for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae Infections in Patients Attending a Clinic for Treatment of Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, The Netherlands. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 829-835, 2001.

VERTERAMO, R. *et al.* Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 16, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/>; PMID: 1921674710.1186/1471-2334-9. Acesso em: janeiro de 2016.

VILLA, L.L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res**, v. 71, p. 321-341, 1997.

WAITES, K.B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R.L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 757-789, 2005.

WALBOOMERS, J. M *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WALKER, J. *et al.* The difference in determinants of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* in a sample of young Australian women. **MC Infect Dis**, v. 1, n. 11, p. 35, 2011.

WARFORD, A.; CHERNESKY, M.; PETERSON, E.M. **Laboratory diagnosis of Chlamydia Trachomatis infections**: Cumulative techniques and Procedures in clinical microbiology. Washington DC: ASM Press 2003, p. 2-18.

WEINSTOCK, H.; BERMAN, S.; CATES, W. Sexually transmitted diseases among american youth: incidence and prevalence estimates, 2000. **Perspect Sex Reprod Health**, v. 36, n. 1, p. 6-10, 2004.

WHILEY, D.M.; TAPSALL, J.W.; SLOOTS, T.P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: an ongoing challenge. **JMD**, v. 8, n. 1, p. 3-15, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATON. WHO. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections**. Geneva: World Health Organization, 2012, p. 20.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Programmes and projects: Cancer. Screening and early detection of cancer**. WHO, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/cytologyscreen/en/index.html>>. Acesso em: janeiro de 2016.

WORKOWSKI, K.A.; LEVINE, W.C. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm REP**, v. 51, n. RR-6, p. 1-78, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/treatment/>. Acesso em: 15/05/2008.

WRIGHT, T.C.; FERENCZY, A.; KURMAN, R.J. Carcinoma and other tumors of the cervix. In: **Blaustein's pathology of the female genital tract**. Springer New York, 1994. p. 279-326.

YAMAGUCHI, M. *et al.* Hematoma and abscess formation caused by *Mycoplasma hominis* following cesarean section. **Int J Womens Health**, v. 17, n. 3, p. 15-8, Ja. 2011.

YOKOYAMA, M. *et al.* Prognostic factors associated with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan. **Cancer Letters**, v. 192, p. 171-179, 2003.

APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice A - Formulário de pesquisa

Número: _____ Prontuário: _____

Nome: _____

Data: _____

Ambulatório

1- Propedêutica do colo

2- Geral

Idade: _____

Motivo encaminhamento:

1- Citologia alterada 2- Área iodo negativa 3- Condiloma 4- Outros

Estado civil:

1- Casada (união estável) 2- Separada 3- Viúva 4- Outro

Início de atividade sexual:

Número de parceiros sexuais

1- Hum 2- Dois a cinco 3- Acima de cinco

Vida sexual ativa

1- Sim 2- Não

Tabagismo

1- Sim 2- Não

Método contraceptivo

1- Nenhum 2- Hormonal 3- DIU 4- Outros

Resultado citologia

- 1- Alterações celulares benignas
- 2- Anormalidades em células epiteliais
Asc-Us Asc-H LSIL ACG HSIL
- 3- Carcinoma de células escamosas
- 4- Adenocarcinoma

Colposcopia

- 1- Achados colposcópicos normais
- 2- Achados colposcópicos anormais
Grau I Grau II
- 3- Suspeita de carcinoma invasivo
- 4- Colposcopia insatisfatória
- 5- Miscelânea

Biópsia

- 1- Cervicite 2- NIC I 3- NIC II 4- NIC III 5- Carcinoma invasivo

Pesquisa HPV

- 1- Positivo 2- Negativo

Pesquisa clamídia

- 1- Positiva 2- Negativa

Pesquisa Neisseria

- 1- Positiva 2- Negativa

Pesquisa ureaplasma

- 1- Positiva 2- Negativa

Pesquisa micoplasma

- 1- Positiva 2- Negativo

Apêndice B - Características das categorias citológicas pelo Sistema Bethesda III

Categoria	Sigla	Característica citológica
Células escamosas atípicas de significado indeterminado - provável reacional	ASC-US	Atipias reacionais. Aumento nuclear duas a três vezes o núcleo da célula intermediária, leve hipercromasia, leve variação do tamanho e forma nuclear e com irregularidade mínima de sua membrana
Células escamosas atípicas de significado indeterminado - provável neoplasia	ASC-H	Alterações um pouco mais intensas que na ASC-US
Lesão intraepitelial de baixo grau	LSIL	Coilocitose (células do porte das intermediárias ou superficiais com núcleos atípicos, halo perinuclear extenso e com bordas espessadas)
Lesão intraepitelial de alto grau	HSIL	Células profundas com cromatina grosseira e desprovida de citoplasma, discarióticas e em fila indiana
Carcinoma de células escamosas	SCC	Células com cromatina grosseira, espaços vazios, nucléolos múltiplos e irregulares. Células de formato anômalo (células em girino).

Fonte: adaptado de Lira Neto (*apud* MORTOZA JÚNIOR, 2006).

Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Estudo controlado da associação entre doenças sexualmente transmissíveis, pela técnica de PCR em tempo real, e papilomavírus humano em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical”.

Será realizado estudo caso-controle, com pacientes do ambulatório de propedêutica do colo do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa, encaminhadas para colposcopia para avaliar a presença de lesão intraepitelial cervical. Os controles serão pacientes atendidas no ambulatório de Ginecologia geral da Santa Casa de Belo Horizonte. Todas serão submetidas a colposcopia e coleta de esfregaço endocervical para pesquisa de papilomavírus humano e de doenças sexualmente transmissíveis: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* e *Treponema pallidum*.

Pretendemos, com este estudo, verificar se há maior prevalência dessas doenças sexualmente transmissíveis com a presença do HPV e da neoplasia intraepitelial cervical, assim como suas associações. Outro motivo que nos leva a estudar esse assunto é a importância de se desenvolver um diagnóstico rápido e eficiente, multiplex, para doenças sexualmente transmissíveis de grande interesse para a saúde pública.

Para este estudo, utilizaremos amostras clínicas do esfregaço cervical, que faz parte dos procedimentos realizados neste ambulatório. Apenas serão acrescentadas as investigações para doenças sexualmente transmissíveis.

Para participar, você não terá qualquer custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em publicação alguma que possa resultar deste estudo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão

arquivados com o pesquisador responsável pelo período de cinco anos e após esse tempo serão destruídos.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Declaro que concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20____

Assinatura do(a) participante

Assinatura do(a) pesquisador

Pesquisador responsável:

Dr Victor Hugo de Melo

Anexo A - Terminologia colposcópica do colo uterino IFCPC 2011
Nomenclatura IFCPC 2011 Aceita no Congresso Mundial do Rio em 5 de
julho de 2011

Avaliação Geral	<ul style="list-style-type: none"> • Coloscopia adequada ou inadequada (especificar o motivo sangramento, inflamação, cicatriz, etc) • Visibilidade da junção escamocolunar: completamente visível, parcialmente visível e não visível • Zona de transformação Tipo 1, 2 ou 3 		
Achados colposcópicos normais	<p>Epitélio escamoso original</p> <ul style="list-style-type: none"> • Maduro • Atrófico <p>Epitélio colunar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ectopia <p>Epitélio escamoso metaplásico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cistos de Naboth • Orifícios (glândulas) abertos <p>Decidua na gravidez</p>		
Achados colposcópicos anormais	Princípios gerais	Localização da lesão : Dentro ou fora da ZT e de acordo com a posição do relógio	
		Tamanho da lesão :Número de quadrantes do colo uterino envolvidos pela lesão e tamanho da lesão em porcentagem do colo uterino	
	Grau 1 (Menor)	Epitélio acetobranco tênue, de borda irregular ou geográfica	Mosaico fino, Pontilhado fino
	Grau 2 (Maior)	Epitélio acetobranco denso, Acetobranqueamento de aparecimento rápido, orifícios glandulares espessados	Mosaico grosseiro, Pontilhado grosseiro Margem demarcada, Sinal da margem interna Sinal da crista (sobrelevado)
	Não específico	Leucoplasia (queratose, hiperqueratose), erosão, captação da solução de lugol: positiva (corado) ou negativa (não corado) (teste de Schiller negativo ou positivo)	
Suspeita de invasão	<p>Vasos atípicos</p> <p>Sinais adicionais: vasos frágeis, superfície irregular, lesão exofítica, necrose, ulceração (necrótica), neoplasia tumoral/grosseira.</p>		
Miscelânea	Zona de transformação congênita, condiloma, pólipos (ectocervical/endocervical), inflamação, estenose, anomalia congênita, seqüela pós-tratamento, endometriose.		

Fonte: Bomstein J, Bosze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, Perrotta M, Prendiville W, Russel P, Sideri M, Strander B, Tome A, Walker P. 2011 IFCCPC colposcopic nomenclature. In preparation for publication.

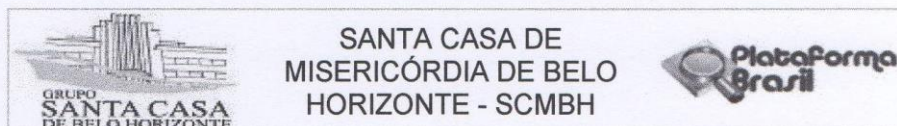
Anexo B - Terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical segundo a orientação de Wright *et al.* (1994), baseada na classificação de Richart (1973)

WHO/ISGYP* classificação	Terminologia do Sistema de Bethesda
Displasia leve (NIC 1)	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (SIL de baixo grau = LSIL)
Displasia moderada (NIC 2)	
Displasia grave/carcinoma <i>in situ</i> (NIC 3)	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (SIL de alto grau = HSIL)

*World Health Organization and International Society of Gynecological Pathologists.

Fonte: Wright, Kurman e Ferenczy (2002, p. 256).

Anexo C – Aprovação do Comitê de Ética



SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo controlado de prevalência de doenças sexualmente transmissíveis, em pacientes portadoras e não portadoras de papilomavirus humano e neoplasia intraepitelial cervical, analisadas pela técnica de PCR em Tempo Real

Pesquisador: Maria Inês de Miranda Lima

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 22053313.5.0000.5138

Instituição Proponente: INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA DA SANTA CASA DE BELO HORIZONTE

Patrocinador Principal: BIOCOD BIOTECNOLOGIA LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 475.165

Data da Relatoria: 29/11/2013

Apresentação do Projeto:

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) as doenças transmitidas sexualmente (DSTs) são infecções transmitidas de pessoa a pessoa por contato sexual. São infecções comuns em toda parte de países desenvolvidos e em desenvolvimento e são consideradas um grande problema de saúde pública. É estimado que a cada ano surgem mais de 300 milhões de novos casos de DSTs bacterianas, incluindo gonorréia, clamídia, sífilis e tricomoníase e sua incidência é aumentada em todo o mundo em adultos de 15 a 49 anos de idade (Greer et al., 2008; Mckechnie et al., 2009). Seu controle é fundamental devido ao alto número de casos agudos, complicações e sequelas, seu impacto socioeconômico e por favorecer o contágio e persistência do papilomavírus humano, o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical e do câncer (Verteramo et al, 2009). Dado o aumento nas condutas sexuais de risco, a menor idade de início da atividade sexual, o maior número de parceiros sexuais na vida das pessoas, entre outros

Endereço: Rua Domingos Vieira 590

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.150-240

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

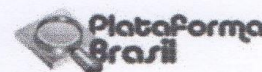
Telefone: (31)3238-8933

Fax: (31)3238-8838

E-mail: cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 475.165

fatores, é importante o uso de métodos de diagnósticos precisos e rápidos, que possibilitem um tratamento precoce e efetivo. Desta maneira poderá diminuir o número de pacientes que são fonte de contágio durante o período de espera dos resultados (Galofre, 2009). Entretanto, devido a alta variabilidade dos patógenos que causam as DSTs, e o envolvimento de mais de um patógeno, existem estudos que pesquisam métodos capazes de identificar simultaneamente múltiplos patógenos em uma única amostra. O carcinoma do colo uterino é uma doença com múltiplos determinantes ambientais e genéticos. As infecções genitais, especialmente as associadas ao papilomavírus humano (HPV) de alto risco, e o comprometimento da resposta imune celular são fatores diretamente envolvidos no processo de transformação maligna (Zur Hausen, 2002). O HPV de alto risco é de fundamental importância para iniciar as alterações pré-neoplásicas, porém não suficientes, avalia-se que a presença de clamídia e outros DSTs estão associadas a maior prevalência de NIC (Da Silva Barros et al, 2012). Veterano e colaboradores em 2009, num estudo controlado, verificaram importante associação de Clamídia e ureaplasma com pacientes HPV positivo, sugerindo que se investigue estas DSTs nas pacientes HPV positivas. Markowska e colaboradores (2005) estudou o papel da infecção crônica por clamídia no desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical e do câncer cervical. A partir destas considerações, com este projeto pretende-se avaliar uma rápida e sensível reação de PCR em tempo real que permita o diagnóstico simultâneo dos seguintes agentes infecciosos: Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae, tornando mais fácil, mais rápido e a um custo menor o diagnóstico das doenças causadas por estes agentes, simultaneamente com a avaliação do HPV e da neoplasia intraepitelial cervical. Deseja se averiguar se existe associação entre maior prevalência de DST (Clamydia, micoplasma, ureaplasma e neisseria) em pacientes portadoras do vírus HPV e em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência de agentes infecciosos causadores de doenças sexualmente transmissíveis

Endereço: Rua Domingos Vieira 590

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.150-240

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

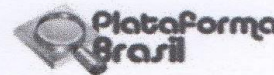
Telefone: (31)3238-8933

Fax: (31)3238-8838

E-mail: cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 475.165

(Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae,) em pacientes assintomáticas de um ambulatório de propedêutica do colo, em comparação a prevalência de pacientes de um ambulatório de ginecologia geral.

Objetivo Secundário:

Avaliar a prevalência de Papilomavírus Humano e identificar quanto ao tipo de HPV nestas pacientes. Avaliar a presença de neoplasia intraepitelial cervical por colposcopia e biópsia no ambulatório de propedêutica do colo. Analisar as associações das DSTs com a presença do HPV e da neoplasia intraepitelial cervical e dados epidemiológicos nos dois grupos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos inerentes ao procedimento de coleta de material biológico.

Benefícios:

Com o desenvolvimento destes processos de diagnósticos, pretende-se validar testes com alta especificidade e sensibilidade com preços mais acessíveis e com prazos de resultados mais rápidos. Além de baixo custo, a metodologia multiplex propiciará o diagnóstico de várias DSTs, melhorando a possibilidade de diagnóstico, tratamento e definição da conduta médica. Avaliando a prevalência destas DSTs nestas pacientes portadoras de HPV/NIC em comparação a um grupo de baixo risco, é importante a discussão deste exame rotineiramente nestas pacientes e contribuir para definição destas co-infecções na história da neoplasia intraepitelial cervical e câncer cervical.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta uma grande relevância clínica e científica. A documentação que compõe o protocolo incluindo o TCLE atende as recomendações éticas previstas na resolução 466/2012 e demais documentos éticos pertinentes. A metodologia proposta está muito bem elaborada e atende aos princípios éticos em pesquisa em seres humanos.

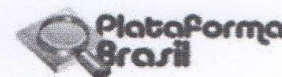
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão devidamente apresentados de acordo com a avaliação deste CEP.

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 475.165

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendada a aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 02 de Dezembro de 2013

Assinador por:

**Francisco das Chagas Lima e Silva
(Coordenador)**

Endereço: Rua Domingos Vieira 590

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.150-240

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3238-8933

Fax: (31)3238-8838

E-mail: cep@santacasabh.org.br

Anexo D – Folha de aprovação

VIA DO ALUNO	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	UFMG
	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER	

Universidade Federal de Minas Gerais
Centro de Pós-Graduação - CPG

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prezado Mestre/ Doutor

Se você é bolsista CAPES, CNPQ OU FAPEMIG, providencie o cancelamento da bolsa. Procure o balcão de atendimento do CPG.

Após a defesa e revisão do trabalho final em decorrência das observações que, porventura, foram emitidas e tomadas em consideração que você tenha sido aprovado, deverá entregar no balcão de atendimento do CPG:

Frequência de doenças sexualmente transmissíveis e associação com neoplasia intraepitelial cervical

1. Um (01) volume da tese/dissertação em capa dura (cor preta), com escrita em dourado. Apenas os mestres e doutores do Programa de Patologia deverão entregar 02 volumes. Informações importantes sobre o volume: A lombada, obrigatoriamente, deve ser gravada com as seguintes informações: título do trabalho, UFMG e o ano de defesa. Quando o título é muito grande, deve-se escrever na lombada pelo menos o nome do aluno, UFMG e o ano. A cópia de uma das defesas e a folha de aprovação devem constar nos anexos do volume. Essas cópias da defesa e da folha de aprovação devem ser entregues no ato de defesa, assinada pelos membros da banca examinadora. A ficha catalográfica (sem obrigatório), pode ser solicitada no site da Biblioteca Nelson Vianna (<http://www.biblioteca.ufmg.br>).

LUIZA DE MIRANDA LIMA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Victor Hugo de Melo - Orientador
UFMG

Prof(a). Agnaldo Lopes da Silva Filho
UFMG

Prof(a). Danielle Alves Gomes Zauli
HERMES PARDINI

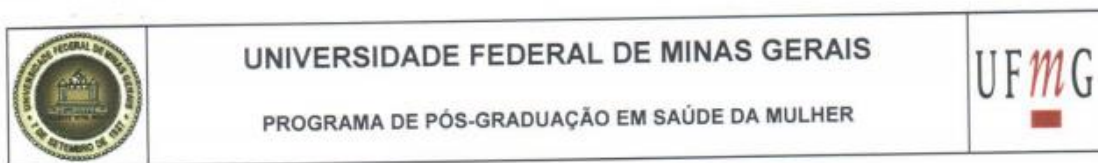
Prof(a). Maria Inês de Miranda Lima
SANTA CASA DE BELO HORIZONTE

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2016.

Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina/UFMG

Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5ª andar - Santa Efigênia
CEP 30130100 - Belo Horizonte MG - Brasil
www.medicina.ufmg.br

Anexo E – Cópia da ata da defesa



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA LUIZA DE MIRANDA LIMA

Realizou-se, no dia 23 de fevereiro de 2016, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina - Sala 062, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Frequência de doenças sexualmente transmissíveis e associação com neoplasia intraepitelial cervical*, apresentada por LUIZA DE MIRANDA LIMA, número de registro 2014652338, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Victor Hugo de Melo - Orientador (UFMG), Prof(a). Agnaldo Lopes da Silva Filho (UFMG), Prof(a). Danielle Alves Gomes Zauli (HERMES PARDINI), Prof(a). Maria Inês de Miranda Lima (SANTA CASA DE BELO HORIZONTE).

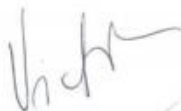
A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

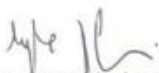
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2016.



Prof(a). Victor Hugo de Melo (Doutor)



Prof(a). Agnaldo Lopes da Silva Filho

(Doutor)



Prof(a). Danielle Alves Gomes Zauli

(Doutora)



Prof(a). Maria Inês de Miranda Lima

(Doutora)