

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA

NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS GUIMARÃES

Prevalência das infecções por Papilomavírus humano e soropositividade de *Chlamydia trachomatis* em mulheres portadoras de neoplasias cervicais na região central do Brasil

GOIÂNIA
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS GUIMARÃES

3. Título do trabalho

**PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO
E SOROPOSITIVIDADE DE *Chlamydia trachomatis* EM MULHERES PORTADORAS
DE NEOPLASIAS CERVICAIS NA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Narriman Kennia da Silva Barros Guimarães, Usuário Externo**, em 17/07/2024, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Helena Rabelo Dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 18/07/2024, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4676977** e o código CRC **1F1D8040**.

Narriman Kennia da Silva Barros Guimarães

Prevalência das infecções por Papilomavírus humano e soropositividade de *Chlamydia trachomatis* em mulheres portadoras de neoplasias cervicais na região central do Brasil.

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.
Área de concentração: Microbiologia**

**Orientadora: Silvia Helena Rabelo dos Santos
Co-Orientadora: Megmar Aparecida Santos Carneiro**

**GOIÂNIA
2009**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barros-Guimarães, Narriman Kennia da Silva
Prevalência das infecções por Papilomavírus humano e soropositividade de Chlamydia trachomatis em mulheres portadoras de neoplasias cervicais na região central do Brasil [manuscrito] / Narriman Kennia da Silva Barros-Guimarães. - 2009.
94 f.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Helena Rabelo-Santos; co orientadora Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2009.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, lista de tabelas.

1. HPV. 2. Chlamydia trachomatis. 3. câncer cervical. 4. NIC. 5. PCR. I. Rabelo-Santos, Sílvia Helena, orient. II. Título.


CDU 579




UFG


UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, S/N- Setor Universitário - Goiânia-GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362 – 3209.6102 – FAX (62)3209.6363
[email: ppgmt@iptsp.ufg.br](mailto:ppgmt@iptsp.ufg.br)

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS - Aos vinte e quatro dias do mês de novembro do ano de dois mil e nove (24/11/2009), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, ROSANE RIBEIRO FIGUEIREDO ALVES e MARIA DE FÁTIMA COSTA ALVES, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E SOROPOSITIVIDADE DE *Chlamydia trachomatis* EM MULHERES PORTADORAS DE NEOPLASIAS CERVICAIS NA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**, em nível de Mestrado, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela orientadora da Mestranda, Profa. Dra. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Mestranda sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o examinando, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 622/2004 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, e procedidas às correções recomendadas, a dissertação foi **APROVADA** por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em MICROBIOLOGIA pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do programa da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo científico, oriundo dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas às modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17h20min a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.


Prof. Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos
Presidente – FF/UFG


Prof. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves
Membro – PUC/GO


Prof. Dra. Maria de Fátima Costa Alves
Membro – IPTSP/UFG


Kariny Vieira Soares e Silva
Secretária da Pós-Graduação

***"A felicidade do corpo consiste na saúde,
e a do espírito, na sabedoria." (Tales de Mileto)***

**Dedico a minha mãe Francisca, meu pai João e
às minhas irmãs Fernanda e Sandra,
por todo incentivo e apoio.**

Agradecimentos

O quão feliz é uma pessoa depende da profundidade de sua gratidão

John Miller

À **Deus** por Seu amor incondicional, pelos dons e graças concedidas à minha vida.

À Professora Doutora **Silvia Helena Rabelo dos Santos** por todo conhecimento transmitido, paciência, profissionalismo, dedicação e confiança.

À Professora Doutora **Megmar Aparecida Santos Carneiro** por toda a disponibilidade auxílio, compreensão e ensinamento.

À Professora Doutora **Rosane Ribeiro Figueiredo Alves** por toda dedicação, trabalho e paciência.

Às meninas da seção de citologia do Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia UFG, **Nádja, Lourdinha e Suelene**, pelo excelente trabalho realizado que muito contribuiu para realização deste trabalho e por toda solicitude.

Aos funcionários do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, em especial as enfermeiras do Ambulatório de Patologia Cervical, pelo trabalho realizado e por todos os favores.

À todos os meus amigos que estiveram ao meu lado durante esta trajetória e me incentivaram, auxiliaram e me apoiaram.

Aos funcionários e professores do *IPTSP*. De modo especial ao **José Clementino**, Zezinho, e a **Kariny Vieira**, por toda dedicação e prestatividade.

À **Andrea, Arlyenne, ao Daniel e Marcelo**, por dividirem muitas vezes os trabalhos e me animarem em vários momentos.

A **CNPq** pelo apoio financeiro.

À **minha família** por todo amor, toda cumplicidade, toda dedicação e todo auxílio... enfim, por fazerem parte da minha vida.

E a todos que contribuíram de algum modo para realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenocarcinoma
C°	Grau Celsius
CH2	Captura Híbrida 2
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
CR1	<i>Região conservada na porção terminal da oncoproteína E7</i>
CR2	<i>Região conservada na porção terminal da oncoproteína E7</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DNA	Deoxyribonucleic acid
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
E1	Early 1 - proteína regulatória E1
E2	Early2 – proteína regulatória E2
E5	Early5 – oncoproteína E5
E6	Early6 – oncoproteína E6
EB	Elementary body
EGRF	Receptor de fator de crescimento epidérmico
EIE	Enzima imuno ensaio
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HE	Hematoxilin and eosin
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano

HR	High risk
HSIL	High squamous intraepithelial lesions
HVS2	Herpes vírus simples tipo 2
hTERT	subunidade catalítica da transcriptase reversa de telomerase humana
ICC	Invasive cervical carcinoma
IFD	Imunofluorescência direta
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IST	Infecção sexualmente transmissível
L1	Late 1- Proteína estrutural
L2	Late 2- Proteína estrutural
LCR	Ligase chain reaction
LIEBG	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau
LIEAG	Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau
LPS	Lipopolissacarídeo
LR	Low risk
LSIL	Low squamous intraepithelial lesions
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Microimmunofluorescence
MOMP	Major outer-membrane protein
NIC	Neoplasia intra-epithelial cervical
OR	Odds ratio
p53	Gene suppressor tumoral
p300	Proteína de 300kDa

p600	Proteína de 600kDa
P/CAF	p300 fator associado
PCR	Polymerase chain reaction
PML	Promyelocytic leukemia protein
pRb	Proteína do retinoblastoma
RB	Reticular body
RIH	Resposta imune humoral
RNA	Ribonucleic acid
STI	Sexually transmitted infection
TGF-α	Fator de crescimento transformante α
VLP	Partículas semelhantes ao vírus
WHO	World Organization of Health

RESUMO

Introdução: Os Papillomavirus humano (HPV) de alto risco oncogênico são os agentes etiológicos da neoplasia cervical. Contudo, a infecção pelo HPV não é suficiente para a carcinogênese, e outras infecções sexualmente transmissíveis (IST) parecem aumentar o risco de neoplasia cervical. A significativa associação entre o HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis no desenvolvimento de neoplasias cervicais tem sido investigada e dados mais consistentes tem apontado para uma associação com a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). A exata relação entre *C. trachomatis* e a infecção por HPV ainda não é completamente entendida. É possível que a infecção por *C. trachomatis* atue como um fator independente ou como um co-fator para o HPV no desenvolvimento de neoplasia cervical. O **objetivo** deste estudo foi avaliar a soropositividade de *C. trachomatis* em mulheres HPV positivas correlacionando com a severidade do diagnóstico de neoplasia cervical em uma área central do Brasil. **Metodologia:** Um total de 131 mulheres encaminhadas a Clínica de Colposcopia, do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia em Goiás, Brasil, devido a um exame citopatológico alterado foram incluídas no estudo. A detecção do DNA do HPV foi realizada por reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando os *primers* PGMY09/PGMY11, e a genotipagem foi realizada por hibridização reversa em pontos. A soropositividade de *C. trachomatis* foi avaliada usando ELISA para detecção de anticorpos IgG. **Resultados:** A prevalência total da infecção por HPV foi 86,3% (113/131). A soropositividade de *C. trachomatis* foi de 26% (34/131). Trinta e uma mulheres (27,3%; 31/113) foram positivas para HPV e *C. trachomatis*. Destas, 12,9% (4/31) tinham diagnóstico histopatológico negativo, enquanto, 87,1% (27/31) tinham diagnóstico histológico de NIC e carcinomas invasivos. O tipo de HPV mais prevalente nas mulheres *C. trachomatis* soropositivas foi o HPV16 (51,6%; 16/31) e nestas mulheres, este tipo estava presente em 50% (2/4) dos casos negativos, 33,3% (3/9) dos casos de NIC1, 53,3% (8/15) dos casos de NIC2/NIC3 e 100% (3/3) dos casos de carcinoma invasivo. Tomando como referência casos negativos para HPV/ *C. trachomatis*, a positividade para HPV/ *C. trachomatis* foi significativamente associada com diagnóstico de NIC2 ou lesão mais severa, especialmente para os tipos 16 e 18. Nenhuma associação foi observada considerando outros tipos de HPV. Nenhuma associação também foi observada considerando casos HPV/ *C. trachomatis* positivos, pegando como referência casos HPV positivos e *C. trachomatis* negativos. Uma significância limítrofe foi observada quando a referência foram casos HPV positivos e *C. trachomatis* negativos. Houve significância limítrofe entre outros tipos de HPV e positividade para *C. trachomatis* com diagnóstico de neoplasia considerando como referência, casos HPV/ *C. trachomatis* negativos. **Conclusão:** A co-infecção HPV/ *C. trachomatis*, especialmente para os tipos 16 e 18, foi significativamente associada com diagnóstico de neoplasia cervical.

Palavras-Chave: *Chlamydia trachomatis*, HPV, neoplasia intraepitelial cervical, carcinoma de células escamosas, esfregaço cervical, PCR e sorologia.

ABSTRACT

Background: High-risk papillomavirus (HPV) is the etiological agent for cervical neoplasia. However, the presence of singly HPV infection is unlikely to be sufficient for cervical carcinogenesis, and other sexually transmitted infections (STI) may increase the risk of cervical neoplasia. The significance of the association between the human papillomavirus (HPV) and other sexually transmitted infections in the development of cervical neoplasias has been investigated and the more consistent data have pointed to an association with *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). However, the exact relationship between *C. trachomatis* and HPV infection remains not completely understood. It is possible that *C. trachomatis* infection may be an independent factor or cofactor for HPV in the development of cervical neoplasia. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the seropositivity for *Chlamydia trachomatis* in HPV-positive women correlating with the severity of cervical neoplasia in central area of Brazil. **Methodology:** A total of 131 women referred to colposcopic clinic, in Goiás, Brazil because of an abnormal cervical smear were included in the study. HPV DNA was detected by polymerase chain reaction using PGMY09/PGMY11 primers, and genotyping was performed by reverse dot blot hybridization. Seropositivity for *C. trachomatis* was evaluated using ELISA for the detection of IgG antibodies. **Results:** The total prevalence of HPV infection was 86.3% (113/131). Seropositivity for *C. trachomatis* was 26% (34/131). Thirty one women (27.4%; 31/113) tested simultaneously positive for *C. trachomatis* and HPV. Of these, 12.9% (4/31) tested negative at histology, while 87.1% (27/31) tested positive for CIN and invasive carcinomas. The most prevalent HPV type in the *C. trachomatis* seropositive women was HPV 16 (51.6%; 16/31) and in these women, this type was present in 50% (2/4) of cases negative, 33.3% (3/9) of cases CIN1, 53.3% (8/15) of cases CIN2/CIN3 and 100% (3/3) of cases invasive carcinoma. Taking as reference cases negative for HPV/ *C. trachomatis*, the positivity for HPV/ *C. trachomatis* was significantly associated with CIN 2 or worse diagnostic, especially the types 16 and 18. A borderline significance was observed when the reference was HPV positive and *C. trachomatis* negative cases. There was a borderline significance between other types of HPV and positivity for *C. trachomatis* with neoplastic diagnosis considering as reference HPV/ *C. trachomatis* negative cases. **Conclusions:** *C. trachomatis* seropositivity was associated with severity of cervical neoplasia in women HPV positives. Then, it may be important to screen for the simultaneous presence of *C. trachomatis* which may have synergistic pathological effects.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; HPV; cervical intraepithelial neoplasia, squamous cell carcinoma, cervical smear, PCR, serology.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta tese está sendo apresentada no formato alternativo de disponibilização de dissertações de mestrado e teses de doutorado no IPTSP/UFG e de acordo com o disposto em “Normas, Coordenadoria de Pós-Graduação em Medicina Tropical (CPGMT) da Universidade Federal de Goiás Nº 01” (2005).

Inclui uma introdução sobre o tema, os objetivos da dissertação, um artigo original submetido à revista *Gynecologic Oncology* – com a descrição dos métodos e resultados obtidos e discussão - e, por fim, uma conclusão e anexos. Nos anexos foram incluídos os modelos do termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) e a ficha para coleta de dados.

As etapas e experimentos necessários ao desenvolvimento desta pesquisa foram realizados nos seguintes locais:

Ambulatório de Patologia Cervical da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

Laboratório de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia UFG.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP/UFG.

Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP.

Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Total prevalence of HPV and Chlamydia trachomatis (CT) infections in women with cervical neoplasia – Página: 64

Tabela 2 Prevalence of specific HPV types and *C. trachomatis* positivity in relation to histologic diagnosis – Página: 65

Tabela 3 Prevalence of HPV types in *C. trachomatis*(CT)-seropositive women in relation to histologic diagnosis – Página: 67

Tabela 4 Association between HPV positivity and *C. trachomatis* (CT) seroprevalence according to histologic diagnosis – Página: 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: HPV em microscopia eletrônica e estrutura genômica do HPV - Página 7

Figura 2: Ciclo biológico da *Chlamydia trachomatis* – Página 27

SUMÁRIO

1-Introdução	01
1.1- Câncer cervical	01
1.2- Papilomavirus humano (HPV).....	04
1.2.1. Biologia do vírus	04
1.2.2- Classificação do HPV	08
1.2.3- Epidemiologia da infecção pelo HPV	09
1.2.4- Tempo de resolução da infecção	10
1.2.5- HPV X Neoplasia Cervical	12
1.2.6- Carga viral e estado físico do DNA do HPV	14
1.2.7- Diagnóstico da infecção pelo HPV	16
1.2.7.1- Detecção clínica	16
1.2.7.2- Citopatologia	16
1.2.7.3- Colposcopia	17
1.2.7.4- Histopatologia	18
1.2.7.5- Sorologia	18
1.2.7.6- Hibridização <i>por Southern Blotting</i>	19
1.2.7.7- Hibridização <i>in situ</i>	20
1.2.7.8- Captura Híbrida 2 (CH2)	20
1.2.7.9- PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	21
1.2.7.9.1- PCR tipo específico	21
1.2.7.9.2- PCR de consensus ou geral	21
1.2.7.9.3- Hibridização reversa em pontos	22
1.2.8- Vacinas contra a infecção pelo HPV	23
1.3- <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
1.3.1- Caracterização e classificação da <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
1.3.2- Biologia da infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	26
1.3.3- Epidemiologia da infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	27
1.3.4- Diagnóstico da infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	29
1.3.4.1- Cultura em células	30
1.3.4.2- Diagnóstico sorológico	30
1.3.4.3- Diagnóstico molecular	32

1.3.5- Vacinas contra a infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
1.4- A associação HPV e <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
1.5- Justificativa	39
2- Objetivos.....	40
2.1- Objetivo geral	40
2.2- Objetivos específicos	40
3- Publicação	41
4- Manuscrito	42
4.1- Título	42
4.2- Abstract	43
4.3- Introduction	45
4.4- Subjects and methods	47
4.4.1- Study subjects and specimens collection	47
4.4.2 -Human papillomavirus DNA detection and typing	48
4.4.3- <i>Chlamydia trachomatis</i>	50
4.4.4- Hystopathology	51
4.4.5- Statistical analysis	51
4.5- Results	51
4.6- Discussion	53
4.7- References	59
4.8- Tables	64
4.8.1- Table 1.....	64
4.8.2- Table 2	65
4.8.3- Table 3	67
4.8.4- Table 4	68
5- Conclusões	69
Referências	70
Anexos.....	88
Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	89
Anexo 2- Questionário padronizado	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer do colo uterino

O Câncer do Colo Uterino é o segundo tipo de câncer entre as mulheres (Snijders et al. 2006) sendo uma significativa causa de mortalidade em várias regiões do mundo (Golijow et al., 2005). No Brasil representa o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, com estimativa de 19 mil casos em 2009, perdendo apenas para os de pele não melanomas e o câncer de mama (INCA, 2009).

O câncer do colo uterino, mesmo com campanhas e métodos de diagnósticos eficazes, continua sendo a principal causa de morte entre mulheres em países em desenvolvimento. No mundo morrem anualmente cerca de 230000 mulheres devido o câncer do colo de útero, dos quais 80% em países em desenvolvimento (Zeferino & Derchain et al., 2006). Este câncer evolui a partir de lesões precursoras, chamadas de neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). Estas lesões, classificadas histologicamente com base na atipia progressiva das células epiteliais (Steenbergen et al., 2005), são usualmente pequenas e frequentemente aparecem como focos de células atípicas que se misturam ao tecido normal, mas sem constituir uma massa tumoral bem definida (Crum et al, 1997).

As NIC são caracterizadas pela perda gradual de funções celulares básicas como divisão e diferenciação. As células anormais perdem gradualmente as funções de controle de crescimento normal, não se diferenciam adequadamente e como consequência, há proliferação desordenada. Se a anormalidade progride, as células perdem gradativamente a

sua capacidade de diferenciação até que toda a espessura do epitélio seja composta por células indiferenciadas (DeMay, 1993, Crum et al., 1997).

A NIC 1 é caracterizada por atipia nuclear mínima, alterações celulares restritas ao terço inferior do epitélio cervical, baixos índices de mitoses e ausência de mitoses bizarras ou anormais. As NIC 2 e NIC 3 são caracterizadas por pleomorfismo e hipercromasia mais intensa. Além disto, as atipias chegam até o terço médio do epitélio cervical no caso das NIC 2, ou ocupam o terço superior do epitélio cervical nas NIC 3 (Crum et al., 1997).

As NIC podem ser diagnosticadas em exame citopatológico de células cervicais esfoliadas e confirmadas por exame histológico de material cervical (Woodman et al, 2007). Para os exames citopatológicos é utilizada a classificação de Bethesda que foi criada para reduzir as categorias de diagnóstico e melhorar a concordância entre observadores, principalmente, relacionada à classificação de NIC, até então também utilizada para exames citopatológicos.

O sistema de Bethesda adotou o termo lesão intraepitelial escamosa (LIE) que são divididas em LIE de baixo grau (LIEBG) e LIE de alto grau (LIEAG) (Solomon & Nayar 2004). O diagnóstico de LIEBG inclui os diagnósticos de NIC 1 e o diagnóstico citopatológico de LIEAG do sistema de Bethesda, corresponde a NIC 2 e NIC 3 (D'Ottaviano et al, 2004; Kurman & Solomon, 1994). A junção entre NIC 2 e NIC 3 na categoria LIEAG foi questionada já que uma lesão do tipo NIC 2 sem tratamento se aproxima mais da NIC 1 que da NIC 3, porém a distinção de NIC 2 e NIC 3 é pouco reproduzível (Solomon & Nayar 2004).

A importância de infecções sexualmente transmissíveis (IST) no desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras, já foi reconhecida há mais de 20 anos (Golijow et al., 2005). A principal descoberta em etiologia de cânceres humanos foi o reconhecimento de que o câncer do colo uterino é consequência da infecção por alguns tipos de Papilomavirus humano (HPV) (Bosch, 2003). Este vírus está presente em mais de 99,7% dos casos de câncer do colo do útero (Walboomers et al., 1999) e é considerado o agente sexualmente transmissível mais comum em vários países (Bosch & Muñoz, 2002).

Infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico adquiridas durante a fase reprodutiva podem causar, o câncer do colo uterino e suas lesões precursoras (Herrero et al., 2005, Castle et al., 2002). Vários fatores secundários parecem influenciar na persistência da infecção por HPV e aumentar o risco de progressão para neoplasia cervical, como o fumo, paridade, o uso de contraceptivos orais (Castle et al., 2002) e outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs). Contudo, a co-infecção que tem tido maior destaque é a de HPV e *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*).

A infecção por *Chlamydia trachomatis* tem sido associada com hipertrofia cervical e indução de metaplasia escamosa fornecendo evidências para um possível papel da *Chlamydia trachomatis* na etiologia das lesões cervicais (Golijow et al., 2005). Além disto, a infecção por *Chlamydia trachomatis* parece aumentar a suscetibilidade ao HPV em um nível basal por facilitar o acesso às células epiteliais basais por micro-abrasões ou por alterar as características das células epiteliais, aumentando a carga viral da infecção e facilitando a persistência. Alternativamente, a infecção concorrente por

Chlamydia trachomatis pode impedir a resolução da infecção pelo HPV por indução de uma mudança no padrão da resposta imune (Samoff et al., 2005).

1.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.2.1. Biologia do vírus HPV

O HPV é um vírus da família *Papillomaviridae* que infecta células epiteliais, é icosaédrico, não envelopado e seu ácido nucléico é constituído de DNA de fita dupla circular variando de 5 a 8 Kbp de tamanho, dividido em região reguladora (LCR – *long control region*), que contém a origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição. As regiões codificadoras são denominadas ORF (*open reading frames*) e contém às sequências precoce e tardia (Southern & Herrington, 1998) (Figura 1).

A região tardia (L-late), que codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2), é responsável pelas etapas finais da replicação do vírus, como síntese de proteínas estruturais do capsídeo (Finnen et al., 2003; Florin et al., 2002).

A região precoce (E-early) codifica as proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e transformação celular, das quais destacam E1, E2, E6 e E7 (Buck et al., 2008). As duas proteínas reguladoras, E1 e E2, modulam a transcrição e replicação (de Villiers et al., 2004).

As oncoproteínas, E6 e E7, modulam o processo de transformação (de Villiers et al., 2004), alteram o metabolismo da célula hospedeira favorecendo o desenvolvimento neoplásico. Estes dois genes causam a inativação de duas importantes proteínas supressoras de tumor – p53 e retinoblastoma (pRb) (Rapose, 2009). Em situações normais, a p53 age como fator de transcrição, se

ligando a seqüências específicas do DNA. A ativação da p53 induz a parada do ciclo celular frente a fatores que danificam o material genético, permitindo o reparo do DNA antes da progressão do ciclo celular. Em algumas condições, a ativação da p53 pode resultar em apoptose celular (Levine, 1991). A pRb, na sua forma ativa, está ligada ao fator de transcrição E2F, inibindo a ação transcricional deste (Classon & Harlow, 2002; Grinstein, 2006). Esta proteína atua na fase G1, controlando a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência da célula.

A oncoproteína E6 se liga e degrada a proteína p53 da célula hospedeira inibindo a apoptose da célula infectada. A oncoproteína E7 se liga a proteína do retinoblastoma (pRb) inibindo sua função. (Scheurer et al., 2005). A perda da função das proteínas regulatórias pode resultar na deficiência ou perda do controle do ciclo celular, conduzindo a célula a um processo de proliferação desregulada, eventualmente propiciando o desenvolvimento de uma neoplasia (Levine, 1991).

Atualmente são descritas novas funções destas oncoproteínas. A oncoproteína E6 tem a função de ativação da telomerase através da expressão da subunidade catalítica da transcriptase reversa de telomerase humana (hTERT). A hTERT é um componente da atividade da telomerase, que em condições normais é expressa somente em células como as *stem cells* (células tronco) . E6 promove a diminuição dos níveis de Notch1, gene humano que atua no controle das decisões do destino das células, mecanismo que tem sido apontado como necessária para sustentar a expressão de E6 juntamente com E7 e para a transformação maligna em fases tardias da carcinogênese cervical. A baixa regulação de Notch1 por E6 parece levar a inibição da diferenciação e

ao crescimento celular anormal. Por fim, E6 também fragmenta as proteínas contendo o domínio PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) que tem o papel de manutenção da polaridade das células, formação das junções de aderência célula-célula e organização de vários complexos sinalizadores de proteínas. Esta fragmentação resulta em perda da polaridade celular ou mudança morfológica associada com a transição epitélio-mesenquimal podendo, portanto, levar a transformação e a carcinogênese (Yugawa & Kiyono, 2009).

As oncoproteínas E7 possuem regiões conservadas em sua porção amino terminal, denominadas CR1 e CR2. CR1 é conhecida por seu papel importante na transformação celular provocada por E7. Recentemente, verificou-se que E7 interage com a proteína RB de 600 kDa, a p600, cuja função é diminuir a sinalização mediada por integrina levando a sensibilização das células à apoptose induzida pelo desprendimento celular. E7 desregula a proteína p600 inibindo indiretamente a apoptose (Yugawa & Kiyono, 2009).

Além disso, E7 interage com p300 fator associado (P/CAF). P/CAF é um coativador transcricional encontrado na proteína RB acetilada, condição necessária para diferenciação celular. P/CAF ao interagir com E7 tem sua atividade de acetiltransferase reduzida levando a supressão da diferenciação dos queratinócitos e fortalecimento do crescimento celular. A expressão de E7 promove ainda o aumento da expressão do proto-oncogene DEK através de via dependente das proteínas da família pRb, e à evasão a senescência celular induzida por PML (promyelocytic leukemia protein), proteína supressora de tumor, favorecendo a transformação oncogênica (Yugawa & Kiyono, 2009).

Além disto, E6 e E7 podem causar desestabilização cromossômica (Zur Hausen, 2000; Moscicki, 2008). A desregulação do complexo ciclina e E/CDK2

E7 de HPV de alto risco, mas não da proteína E7 de HPV de baixo risco resulta em multiplicação excessiva de centrosomos multipolares aberrantes. Além disto, E6 e E7 induzem cooperativamente aberrações numéricas nos centrosomos e eventuais aneuploidias em células super-expressando E6 e/ou E7. A quebra da ponte de fusão cromossômica favorece rearranjos cromossômicos, incluindo translocações, adições e exclusões. E6 e E7 também aumentam a expressão de genes envolvidos na transição da fase G à fase M do ciclo e progressão da mitose. Portanto, é altamente provável que E6 e E7 causem a perda da integridade dos cromossomos a nível numérico através de múltiplas vias, que inclui a desregulação da expressão gênica e mitótica, embora os mecanismos moleculares subjacentes precisem ser definidos com mais detalhes (Yugawa & Kiyono, 2009)

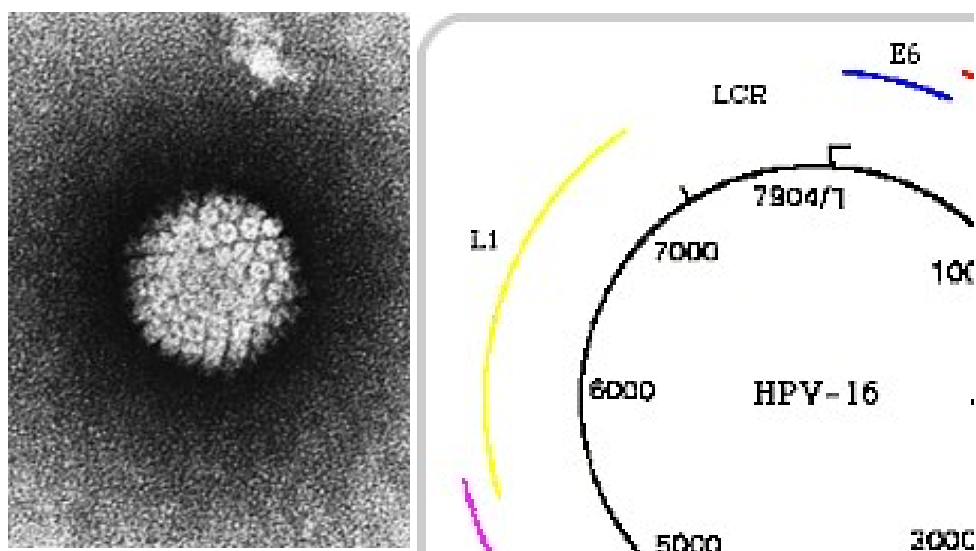


Figura 1: HPV em microscopia eletrônica e estrutura genômica do HPV.

Fonte: Wikipedia, the Free Encyclopedia e www.citocamp.com.br/hpv/hpv.html

1.2.2. Classificação do HPV

Mais de 200 tipos virais de HPV já foram identificados, cerca de 40 destes infectam o trato genital feminino (García-Espinosa et al., 2009). Estes tipos podem ser classificados de acordo com vários critérios, por exemplo, seu tropismo, potencial oncogênico e classificação filogenética. Em relação ao tropismo, mais de 30 tipos são comumente encontrados no trato genital (Szostek et al., 2008) isolados em lesões genitais benignas e malignas (Carvalho et al., 2005).

Os tipos de HPV são divididos em subgrupos que infectam a mucosa e os vírus individuais são designados de alto e baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas a progressão maligna (de Villiers et al., 2004). Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico, freqüentemente associados às NIC de baixo grau e a condilomas acuminados, são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem freqüentemente associados às NIC de alto grau e as neoplasias invasoras são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (Muñoz *et al.* 2003).

Filogeneticamente, os HPV que infectam humanos estão classificados dentro dos gêneros, alfa-, beta-, gama-, mu- e ni-papilomavirus. O gênero de maior importância clínica é o alfa-papilomavirus, no qual se destaca as espécies 9, 7 e 10 que incluem respectivamente os tipos oncogênicos 16 (espécie 9), 18 (espécie 7), e os tipos não oncogênicos 6 e 11 (espécie 10) (de Villiers et al., 2004; Hoory et al., 2008).

1.2.3. Epidemiologia da infecção pelo HPV

Os HPVs são epiteliotrópicos por natureza e seu ciclo de vida está intimamente ligado à diferenciação das células escamosas. No colo do útero, a infecção se inicia nas células epiteliais proliferativas através de pequenas abrasões no tecido ou na zona de transformação. Na zona de transformação o epitélio colunar se transforma em epitélio escamoso no processo denominado metaplasia e por causas não completamente compreendidas, os HPVs tendem a causar lesões nessa área (Moscicki et al., 2006). Uma vez que o HPV penetra nas células-alvo, pode permanecer latente ou adotar a replicação no núcleo, que termina na síntese e liberação de partículas virais infectantes por células mais amadurecidas (Alvarenga et al., 2000).

A curva de prevalência da infecção por HPV varia de 5 a 64%, nas diversas regiões do mundo, na dependência da técnica de detecção empregada, do espécime empregado, das características sócio-demográficas e de comportamento sexual da população estudada. A prevalência da infecção por HPV em mulheres normais, em diferentes populações e sem considerar a idade, varia entre 1,4% na Europa a 25,6% na África (Clifford et al., 2005). A proporção de mulheres portadoras do HPV é de 15 a 40% em jovens, sexualmente ativas e de 3 a 10% em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos. (Bosch, 2003).

O primeiro padrão de prevalência da infecção por HPV mostra taxas maiores em mulheres abaixo dos 25 anos, diminuindo linearmente após esta idade (Franco et al., 1999; Sanjose et al., 2003). Um segundo padrão de prevalência da infecção genital por HPV segue um modelo de curva bimodal em forma de “U” com maior predomínio entre as jovens, declínio na terceira década e novo pico ao redor de 55 anos ou mais (Herrero et al., 2005; Lazcano-Ponce et

al., 2001). Uma possível explicação para este fato poderia ser uma reativação de infecções latentes e a possibilidade de alguma falha no sistema imunológico das mulheres mais velhas (Giuliano et al., 2005).

Rama e colaboradores (2008), em um estudo conduzido no Brasil encontraram uma prevalência de 14,3% em mulheres na faixa etária de 15 a 65 anos, com resultado de exame citopatológico normal. Alves, (2006) em estudo realizado em adolescentes da região noroeste de Goiânia, observou uma prevalência de 88,4% (107/121) de HPV de alto risco oncogênico, e de 11,5% (14/121) de HPV de baixo risco oncogênico.

1.2.4. Tempo de resolução da infecção

A infecção genital pelo HPV pode resultar em três possibilidades de manifestação. As infecções ativas clínicas que são representadas pelas verrugas genitais, também chamadas de condiloma acuminado. As subclínicas geralmente associadas aos tipos de HPV de alto risco, responsáveis pelas alterações celulares que podem resultar em neoplasias intraepiteliais. São também denominadas de condilomas planos e visualizadas pelo colposcópico após aplicação de ácido acético. Por fim, a infecção latente ou inativa, que compreende o período de incubação do vírus e pode se estender indefinidamente. Nesta infecção não há alterações na citologia, colposcopia e histologia e é definida pela presença do DNA viral (Russomano et al., 1998). Contudo, a infecção pelo HPV não é causa suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical já que a maioria das infecções desaparece espontaneamente dentro de um a dois anos sem manifestações clínicas (Zeferino & Derchain, 2006).

Vários estudos têm demonstrado forte associação entre o número de parceiros durante a vida e a aquisição do HPV genital. O número de parceiro é considerado o mais consistente fator de risco para a infecção pelo HPV (Baseman & Koutsky, 2005). As infecções persistentes com HPV de alto risco são as que representam aumento no risco para as NIC e cânceres invasivos (Scott et al., 2001). Fatores como início precoce da atividade sexual (IAS), número de parceiros sexuais, tabagismo e o uso de contraceptivos orais, estão relacionados ao processo de aquisição da infecção por HPV e sua persistência.

A persistência de infecção pode ser definida como a detecção de um mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes em certo período, não havendo consenso de quanto tempo seria esse período (Schiffman & Kjaer, 2003). A persistência da infecção tem sido relacionada a vários fatores, entre eles, mecanismos de evasão a resposta imune (Stern, 2005), já que na persistência da infecção e no desenvolvimento de lesões há diminuição numérica e alterações morfológicas e funcionais das células apresentadoras de antígenos com diminuição numérica variável das células T intra-epiteliais (Scott *et al.* 2001).

Tipos específicos de HPV determinam diferentes riscos para a persistência e a progressão determinada pelo vírus. O risco de carcinoma cervical é principalmente associado aos HPV 16, 18 e 45. Quando persiste por dois anos o HPV 16 possui maior capacidade de causar NIC e câncer do que qualquer outro tipo potencialmente oncogênico (Wheeler et al. 2009). Comparativamente outros tipos têm um risco absoluto muito menor (Snijders et al. 2006).

A persistência também tem sido relacionada com a presença de co-infecção por outras IST (Murta et al., 2000; Samoff et al., 2005; Paba et al., 2007). Estudos indicam que a infecção por *Gardnerella vaginalis* parece favorecer

a infecção pelo HPV (Murta et al., 2000) mostrando alguma associação com o desenvolvimento de NIC (Platz-Christensen et al., 1994), ainda que haja controvérsias a respeito desta associação. O vírus herpes simples tipo 2 (HSV2) também parece iniciar a carcinogênese em células infectadas pelo HPV, havendo um sinergismo desta co-infecção na etiologia do câncer cervical (Paba et al., 2008), particularmente dos adenocarcinomas. O foco principal destas investigações tem sido a co-infecção com *C. trachomatis* como o potencial co-fator no desenvolvimento de câncer cervical. (Antilla et al., 2001. Smith et al., 2002). O papel da *C. trachomatis* tem sido relacionado com a sua natureza assintomática, persistência se não tratada, indução de inflamação crônica e metaplasia (Smith et al., 2002).

A associação entre tabagismo e câncer cervical tem sido demonstrada por diversos estudos que reportam evidências do aumento do risco de desenvolver NIC de alto grau e câncer cervical em tabagistas (Rosa et al., 2009). A relação entre o uso de contraceptivos e a infecção pelo HPV é dificultada devido à forte e consistente associação entre o uso de contraceptivos orais e atividade sexual (Baseman & Koutsky, 2005). O mecanismo pelo qual os hormônios influenciariam na carcinogênese do câncer cervical não está bem esclarecido, mas acredita-se que os hormônios promoveriam a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro com desregulação da expressão das proteínas E6 e E7 (Rosa et al., 2009)

1.2.5. HPV X Neoplasia cervical

Praticamente todos os casos de câncer cervical e suas lesões precursoras, NIC2/3, são precedidas por infecção persistente por HPV de alto

risco oncogênico (Ho et al., 1995; Wallin et al., 1999; Kjaer et al., 2002). Stevens et al.,(2006) avaliando 493 peças de biópsias com diagnóstico de NIC2 e NIC3 e câncer cervical identificaram o HPV16 e HPV52 como os genótipos predominantes entre os casos de NIC2. Nos casos de NIC3 e câncer cervical os genótipos mais freqüentes foram os tipos 16 e 18. Em mulheres encaminhadas com citopatologia alterada, Stevens et al., (2009) avaliaram a distribuição dos tipos específicos de HPV nos diferentes diagnósticos histopatológicos. Os HPV de alto risco oncogênico foram os mais prevalentes, o tipo 16 foi mais freqüente em todos os diagnósticos.

Clifford et al., (2003) em uma meta-análise avaliaram a distribuição dos tipos de HPV nas lesões cervicais de alto grau e nos cânceres cervicais. Estes autores observaram que os tipos 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 e 35 foram os mais prevalentes e que depois dos tipos 16 e 18, o tipo mais importante parece ser o 45, seguido pelos tipos 31, 33, 58 e 52 com importância relativa de cada um variável por região. No trabalho realizado por Zuna et al.,(2007) o padrão de distribuição dos tipos de HPV nas lesões intraepiteliais foi altamente variado. Na LIEAG-S(severa) (HSIL-S –NIC3) o tipo 16 foi o mais prevalente, seguido pelos tipos 52, 39 e 18. Nas LIEAG-M (moderada) (HSIL-M -NIC2) e LIEBG (NIC1) foi ampla a gama de tipos de HPV sem nenhum genótipo dominante. Para LIEAG-M os tipos 16, 51 tiveram a mesma prevalência, seguidos pelos tipos 52, 31 e 35. Nas LIEBG o tipo mais freqüente foi o HPV51, seguido pelos tipos 53 e 66 e os tipos 16 e 56.

No estudo realizado por Pitta et al., 2009, os HPV mais prevalentes em mulheres com diagnóstico histopatológico de NIC2 e NIC3 encontraram o HPV16 como o tipo mais prevalente, seguido pelos tipos 58, 33, 52, 31, 51 e 18. A

prevalência das infecções múltiplas foi maior que as infecções por um único tipo e a associação mais freqüente de tipo nas infecções múltiplas foi do HPV16 com os tipos 58, 52, 18 e 33 (Pitta et al., 2009).

1.2.6. Carga viral e estado físico do DNA do HPV

O vírus HPV penetra nas células da membrana basal do epitélio cervical, porém estas não permitem sua replicação, portanto, são ditas não permissivas. Na camada basal, permanece uma fração circular viral de DNA extracromossômico denominada episomo. A transcrição simples do episomo viral restrita a camada basal fornece uma reserva de células infectadas. À medida que se processa a maturação do epitélio de revestimento cervical, suas células migram para camada superficial, e progressivamente vão se tornando permissivas, possibilitando a replicação independente do DNA viral. Diferentemente das lesões pré-neoplásicas que contem o DNA do HPV na forma episomal, muitos carcinomas parecem abrigar o DNA viral integrado ao cromossomo da célula hospedeira. O DNA viral integrado ocorre como cópias unitárias ou amplificadas mais de 10 a 50 vezes. O vírus encontrado na forma extracromossômica pode replicar-se, porém nas células latentemente infectadas e transformadas, a replicação viral não é permitida para a produção de vírions maduros (Alvarenga et al., 2000).

Em lesões de pele benignas, associadas ao HPV, o genoma viral encontra-se na forma episomal. Nos casos que evoluem para o câncer, os genomas na forma episomal passam em algum momento, a integrar o genoma

da célula do hospedeiro, causando alterações morfológicas da célula, alterando seu controle do ciclo celular e levando a lesões precursoras (Rosa et al., 2009).

Estudos têm indicado que a alta carga viral é um importante fator de risco para neoplasia do colo de útero (Schlecht et al., 2003) , contudo lesões severas também podem estar associadas a cargas virais baixas (Gravitt et al., 2003). A redução no número de cópias virais poderia ser explicada pela interrupção dos genes virais E1/E2 por ocasião da integração do genoma viral no DNA celular. A frequência de integração viral parece aumentar com o grau de severidade da doença, então potencialmente correlacionando-se com a progressão ao câncer cervical (Wang et al., 2003).

Contudo, a importância biológica da integração ainda é motivo de discussão e a maioria dos estudos indica que as formas epissomal e integrada frequentemente coexistem e podem ser encontradas não só em lesões de alto grau e carcinomas invasores (Wang et al., 2003; Peitsaro et al. 2002). É possível que uma alta carga viral aumente a probabilidade de integração dentro de sítios cromossomiais favoravelmente selecionados para adquirir vantagem de crescimento. A integração ao levar a expressão desregulada e aumentada dos oncogenes virais, favorece a seleção de clones de células com expressão gênica otimizada. Portanto esta mistura de formas de HPV pode levar a suposição de que existam clones de células em estágios de progressão distintos. Dessa forma, as células que ainda apresentam o genoma viral na forma epissomal estariam em um estágio do processo de transformação anterior às células que já apresentam o genoma do HPV integrado. De fato lesões escamosas pré-malignas e malignas contêm um grande número de partículas virais epissomais associadas a seqüências integradas de DNA de HPV (Peitsaro et al. 2002).

1.2.7. Diagnóstico da infecção pelo HPV

Existem muitos métodos para detectar a infecção pelo HPV. Estes podem ser classificados em indiretos (colposcopia, citologia, histologia e sorologia) e diretos (microscopia eletrônica, detecção do DNA por hibridização – Southern Blotting e Captura Híbrida e PCR (Gross & Barrasso, 1999; Hubbard, 2003; Molijn et al., 2005). Para a detecção ser eficiente é necessário que os testes empregados apresentem alta sensibilidade e especificidade, além de serem seguros, reprodutíveis, de baixo custo (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

1.2.7.1. Detecção Clínica

O método mais simples de detecção da infecção genital pelo HPV é a observação das verrugas genitais a olho nu quando a infecção apresenta-se na forma clínica, porém, apenas 5% da população infectada pelo HPV, apresentam condiloma acuminado.

1.2.7.2. Citopatologia

A primeira forma de detecção de alterações compatíveis com a infecção pelo HPV foi à coloração feita pelo método de Papanicolaou. Ainda hoje, o teste é utilizado no rastreamento das lesões provocadas pelo HPV nos programas de triagem, tendo em vista a sua abrangência, o baixo custo e facilidade de execução (Cavalcanti & Carestiato, 2006) A sensibilidade varia de 50% a 90% e a especificidade de 70% a 90% (CDC, 2004). O método utiliza esfregaços celulares que são fixados em lâmina e posteriormente corados. A observação de alterações celulares típicas como coilocitose, mudanças na forma e no tamanho nuclear e na

distribuição da cromatina, compatíveis com a infecção pelo HPV (Fehrmann et al., 2003).

1.2.7.3. Colposcopia

É um método de ampla aceitação mundial para o diagnóstico de pacientes com citologia anormal, a sua prática requer um treinamento adequado e uma análise constante de sua qualidade. O exame é realizado por meio do colposcópico, aparelho que tem uma lente que amplia de 4 a 40 vezes a imagem, no qual se aplica uma solução de ácido acético entre 3% a 5% e onde houver anormalidades histológicas o epitélio torna-se esbranquiçado (acetobranco) devido à precipitação de proteínas (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

A colposcopia apresenta como vantagem o diagnóstico imediato e como desvantagem, além do seu caráter subjetivo, o custo elevado e a necessidade de longo treinamento do profissional médico para sua interpretação (Wright et al., 2002). Mitchell et al (1998) relataram uma sensibilidade de 85% e especificidade de 69% da colposcopia para distinguir colo normal e lesões de baixo grau das lesões de alto grau. Sua acurácia é maior em lesões extensas (Pretorius et al., 2001) e em mulheres jovens (Zahm et al., 1998). A exposição da junção escamo-colunar e a visualização do epitélio escamoso espesso permitem melhor avaliação dos critérios de gradação da imagem colposcópica. Entretanto, estes critérios são de menor importância em mulheres acima de 35 anos, possivelmente pela diminuição da espessura epitelial que ocorre nesta faixa etária (Zahm et al., 1998). Na pré e pós-menopausa, a sensibilidade é ainda menor, devido à possibilidade de migração da junção escamo-colunar para dentro do canal, o que torna a avaliação colposcópica insatisfatória (Coppleson et al., 1993).

1.2.7.4. Histopatologia

Este método não identifica o HPV, ele apenas observa as alterações patológicas, características da infecção pelo HPV, como hiperplasia, coilocitose, disceratose, paraceratose e atipias nucleares. O resultado baseia-se na graduação das lesões cervicais (Cavalcanti & Carestiato, 2006). Dores et al indicaram uma sensibilidade de 87,4% e especificidade de 15,1% para o diagnóstico de alterações sugestivas de infecção pelo HPV .

1.2.7.5. Sorologia

Como a infecção pelo HPV é seguida por resposta imune humoral contra a proteína maior do capsídeo, com anticorpos detectáveis por muitos anos, a sorologia não é adequada para distinguir as infecções presentes e passadas (Molijn et al., 2005).

A abordagem que proporcionou um novo impulso aos estudos de imunologia das infecções pelo HPV, e em desenvolvimento de ensaios sorológicos, foi a produção de partículas semelhantes aos capsídeos virais (VLP) de HPV16 (Kirnbauer et al., 1994). Esta produção é efetuada através da infecção de baculovirus recombinantes com o gene L1 ou com genes L1 e L2 em células de inseto. Estes capsídeos gerados são semelhantes em conformação com os vírions selvagens infecciosos, entretanto não possuem o material genético, potencialmente oncogênico, responsável pelo estabelecimento da infecção viral. Esta propriedade propicia o seu uso como antígeno viral em imunoenaios desenvolvidos para avaliar a resposta imune humoral (RIH) contra o vírions do

HPV. Assim, a RIH contra o HPV é geralmente por ensaios inunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA ou enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando VPLs de HPV tipo-específicas adsorvidas às placas. Este ensaio permite a pesquisa da resposta imune dirigida contra epítomos conformacionais representativos de lesões que apresentam infecções produtivas de partículas virais (Gross & Barrasso, 1999). O ensaio de ELISA com VLPs mostra sensibilidade entre 50 e 60% e especificidade maior que 90% (Sichero et al., 2005; Pagliusi et al., 2006). Porém, como limitação desta técnica está o fato que o desenvolvimento de anticorpos detectáveis contra a VLP nem sempre ocorre depois de uma infecção natural pelo HPV. Em algumas mulheres, os níveis de anticorpos não são detectáveis pelo ELISA e a sua soroconversão pode ser perdida pelo declínio devido seu declínio (Pagliusi et al., 2006).

1.2.7.6. Hibridização por *Southern Blotting*

Técnica de isolamento direto do DNA do HPV. Nesta técnica, o DNA é digerido com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em um gel de agarose. Os fragmentos de DNA fita dupla são visualizados por coloração com brometo de etídio, desnaturados *in situ* com hidróxido de sódio e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon por capilaridade, com o auxílio de uma solução de alta concentração salina (Murray et al., 1999). Esta é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, porém laboriosa e inadequada para amplos rastreamentos (Molijn et al., 2005).

1.2.7.7. Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de RNA ou DNA a partir de sondas específicas. Com esta técnica, é possível identificar DNA do HPV em células. Entretanto, a sensibilidade do exame é menor com essa técnica porque o DNA viral está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula. É uma técnica mais sensível que a imunohistoquímica, porém inferior a reação e cadeia da polimerase (PCR) (Birner et al., 2001). A hibridização *in situ* possui sensibilidade de 70% e especificidade de 63% (Do Carmo & Fiorini, 2007).

1.2.7.8. Captura Híbrida 2 (CH2)

É um método não radioativo de sinal de amplificação baseado na hibridização do DNA alvo do HPV marcados com sondas de RNA em solução. O híbrido RNA-DNA resultante é capturado em microplacas e são detectados por anticorpos monoclonais específicos e substrato quimioluminescente, promovendo uma medida semi-quantitativa do DNA do HPV. Como limitação esta técnica apesar de distinguir entre HPV de alto e baixo risco oncogênico, ela não permite a identificação de tipos específicos de HPV. Esta técnica apresenta sensibilidade superior a Hibridização *in situ* e similar a técnica de PCR (Molijn et al., 2005). O teste de CH2 apresenta especificidade de 97,6% e sensibilidade de 98,1% (Stillman et al., 2009).

1.2.7.9. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Os testes para detecção do HPV usando sondas de ácidos nucleicos são comercialmente disponíveis desde a década de 1980. A PCR é o método mais usado de amplificação usando um processo de termociclagem empregando *primers* de oligonucleotídeos para a região de interesse para amplificar o DNA na presença de DNA polimerase termoestável (Molijn et al., 2005). Para uma identificação precisa do HPV foram necessários diferentes estudos descrevendo uma variedade de *primers* e procedimentos de PCR, cada um desses variando em sensibilidade e especificidade. Duas técnicas de detecção do DNA do HPV por PCR são relevantes.

1.2.7.9.1. PCR tipo específica

Usada para amplificação de um único genótipo utilizando *primers* específicos. Para detectar o DNA do HPV em amostras simples devem ser realizadas múltiplas reações de PCR tipo específica separadamente. É uma técnica laboriosa, cara e o *primer* para cada PCR tipo específica, deve ser validado (Molijn et al., 2005).

1.2.7.9.2. PCR de *consensus* ou geral

Usada para amplificar amplo espectro de genótipos de HPV e identificar novos tipos virais. A região L1 é a região mais conservada do genoma do HPV por isso, vários *primers* são direcionadas a esta região (Molijn et al., 2005).

Diferentes conjuntos de *primers* de consenso foram desenhados e construídos para este propósito; entre eles: MY09/MY11 e GP5+/6+. Os *primers*: MY09/MY11 e GP5+/6+ amplificam fragmentos de DNA correspondentes à sequência de ORF de L1 do genoma do HPV, conservada entre os diferentes genótipos (Tham et al., 1991). Os *primers* MY09/MY11, precisam de alta temperatura de anelamento, o que ocasiona degeneração na síntese de oligonucleotídeos por isso, são chamados de *primers* degenerados. Estas degenerações não permitem que a reação seja altamente reprodutível e que haja variação nos oligonucleotídeos de uma reação para outra (Molijn et al., 2005).

Alternativamente há alguns *primers* que precisam de temperatura ótima de anelamento, são os chamados *primers* não degenerados que sintetizam oligonucleotídeos com alta reprodutibilidade. São exemplos destes *primers*: PGMY 09/11 (Molijn et al., 2005).

Atualmente existem várias modificações da técnica de PCR convencional, sendo as principais a PCR em Tempo Real ou Q-PCR (PCR quantitativa), RT-PCR (PCR por Transcrição Reversa, para se amplificar amostras de RNA) e a PCR Multiplex, a qual pode ser aplicada para a amplificação de vários loci em uma mesma reação (Do Carmo & Fiorini, 2007).

1.2.7.9.3. Hibridização reversa em pontos

A tecnologia de hibridização reversa utiliza uma tira de membrana contendo várias sondas imobilizadas como linhas paralelas, chamadas line probe assay (LIPA); ensaio line blot (LBA) ou da matriz linear (AL) (Gravitt et al., 2000; Molijn et al., 2005). Este método fornece uma ferramenta atraente para hibridação

simultânea de um produto da PCR com múltiplas sondas de oligonucleotídeos, e compreende a imobilização de sondas em uma fase sólida e do produto da PCR em fase líquida. O produto da PCR é gerado, usando *primers* biotinizados. Este é desnaturado em condições alcalinas e adicionado em solução tampão de hibridização. Após a hibridação, o material é lavado, e os híbridos podem ser detectados pela adição de um conjugado de estreptavidina e um substrato, gerando cor na linha de sonda, que pode ser visualmente interpretada. Este método permite a detecção de múltiplos tipos de HPV com uma alta sensibilidade em uma única etapa e requer somente uma quantidade limitada do produto da PCR (Molijn et al., 2005; Gravitt et al., 2000).

1.2.8. Vacinas contra a infecção pelo HPV

A relação causal entre a infecção pelo HPV e a transformação maligna na neoplasia cervical, favoreceu o desenvolvimento de vacinas contra o HPV. Há duas classes de vacinas, as terapêuticas e as profiláticas (Stern, 2005). As vacinas terapêuticas ainda não são comercializadas apesar de vários estudos descreverem modelos pré-clínicos da vacina baseado em peptídeos ou proteínas oncogênicas, plasmídios de DNA e diferentes vetores virais (Frazer, 2004).

Já as vacinas profiláticas já foram aprovadas pela FDA estando duas disponíveis no mercado. A primeira é comercializada pela Merck & Co., a Gardasil, desenvolvida contra 4 tipos de HPV, sendo dois de baixo risco oncogênico, os tipos 6 e 11, que causam a maioria dos casos de condiloma acuminado, e dois de alto risco oncogênico, os tipos 16 e 18, presentes na maioria dos casos de câncer cervical. A segunda foi desenvolvida pela

GlaxoSmithKline, a Cervarix, cujo alvo são os HPV de alto risco oncogênico, tipos 16 e 18 (Franco et al., 2008). As duas vacinas utilizam partículas semelhantes a vírus (VLPs) formadas de proteínas L1 recombinantes do capsídeo de diversos tipos de HPV para prevenir as lesões pré-neoplásicas e cânceres (Crosbie et al., 2007; Schwarz, 2007). Tanto a Gardasil como a Cervarix têm demonstrado eficácia de 90% contra infecções persistentes pelos tipos 16 e 18 (Cutts et al., 2007). A proteção para as infecções pelo HPV para a Cervarix demonstrou ser de 6,4 anos pós vacinação e de 5 anos para Gardasil (Villa et al., 2006).

O conhecimento da carga de doença, segurança e eficácia da vacina contra o HPV não é suficiente para decidir a introdução da vacina contra o HPV. A estimativa de custos e benefícios da vacina contra HPV precisam ser comparados aos de outras intervenções. A magnitude do benefício em um determinado país dependerá a incidência, mortalidade, tratamento, custos atribuíveis a doença e aos genótipos HPV contra as quais as vacinas proteger, bem como sobre a eficácia da vacina, cobertura possível e duração de proteção (Cutts et al., 2007). Além disso, o potencial futuro da introdução das vacinas contra o HPV cria oportunidade para fortalecimento dos sistemas de saúde, de estabelecimento de novas parcerias para produção de vacinas e a monitorização dos impactos da vacinação (Cutts et al., 2007).

Estudos apontam que a vacinação tem diminuído a incidência dos HPV 31, 33, 45, 52 e 58 através da proteção cruzada conferida pela vacina contra os tipos 6, 11, 16 e 18. A proteção cruzada é mais aparente e consistente para membros da espécie 9, tipos 31, 33, 35, , 52 e 58, que para os membros da espécie 7, tipos 39 45 e 59 (Brown et al., 2009; Massad et al., 2009).

Para uma melhor aplicabilidade das vacinas em programas de *screening* diminuindo os custos destes programas através de triagem mais tardia e em espaços maiores de tempo, será necessário o desenvolvimento de um sistema de registro de vacinação de adultos eficaz e com ampla participação de clínicas, o que atualmente não é adequado. Além do que esta vacinação deverá atingir todos os níveis socioculturais para que seja real seu papel na estratégia de prevenção do câncer cervical e de suas lesões precursoras (Massad et al., 2009)

1.3 CHAMYDIA TRACHOMATIS

1.3.1. Caracterização e classificação da *Chlamydia trachomatis*

Chlamydiae são bactérias patogênicas, com parede celular semelhante a das bactérias gram-negativas, imóveis e parasitas. 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 a *C. pecorum*, estão associadas a doenças em humanos (Smith et al., 2002).

A *C. trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta as células epiteliais humanas do trato genital e do tecido ocular (Golijow et al., 2005). O genoma da *Chlamydia trachomatis* é formado por cromossomo circular com 1.042.519 bp e um plasmídeo com 7493bp, o genoma é extremamente pequeno e completo e contém RNA ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S (Thomas et al., 1997).

As cepas de *C. trachomatis* são classificadas em sorotipos ou sorovariantes por imunotipagem usando anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para proteína principal da membrana externa (MOMP) depois de cultura de cepas (Bandeia; 2001). Porém na rotina dos laboratórios o diagnóstico da infecção tem sido feito utilizando técnicas moleculares e quando se deseja conhecer as sorovariantes, a identificação é feita com base na diferença na sequência de nucleotídeos do gene *ompA* que codifica a MOMP. Análises filogenética do *ompA* divide as cepas dentro de três principais sorogrupos e muitas sorovariantes, incluindo o sorogrupo B que compreende as sorovariantes B/BA, D/Da, E, L1, e L2/L2a, o sorogrupo C que compreende as sorovariantes A, C, H, I/la, J, K e L3, e o sorogrupo intermediário I que compreende as sorovariantes F, e G/Ga (Yuan et al., 1989; Quint et al., 2007).

As sorovariantes A e B, certamente as cepas da sorovariante BA, e a sorovariante C, são comumente associadas com a doença ocular, tracoma (Mabey & Solomon, 2003). As sorovariantes BA, D/Da, E, H, I/la, J, K, F e G/Ga são comuns no trato urogenital e podem algumas vezes ser detectadas no trato respiratório de crianças devido a transmissão no momento do parto (Darville, 2005). Por fim, as sorovariantes L1, L2/L2a e L3 estão associadas com uma específica e distinta condição, o linfogranuloma venéreo (Mabey & Peeling, 2002).

1.3.2. Biologia da infecção pela *Chlamydia trachomatis*

A *C. trachomatis* se apresenta de duas formas, uma infecciosa extracelular, o corpo elementar (EB) de 350 nm de diâmetro, que entra no endossoma da célula hospedeira através de fagocitose, pinocitose ou endocitose

mediada por receptores na superfície da célula epitelial susceptível à infecção; e uma forma replicativa metabólica não-infecciosa, o corpo reticular (RB), de 800 a 1000nm de diâmetro. O ciclo biológico é completado dentro do endossoma e se organiza na forma do corpo reticular (RB), maior em tamanho e mais rico em RNA (Hall, 1997). Aproximadamente 8 horas, o corpo reticular começa a se dividir e em 18-24 horas, retorna a forma de corpo elementar, que é lançado para o meio extracelular, podendo iniciar um novo ciclo de infecção (Stamm et al., 2005) (Figura 2).

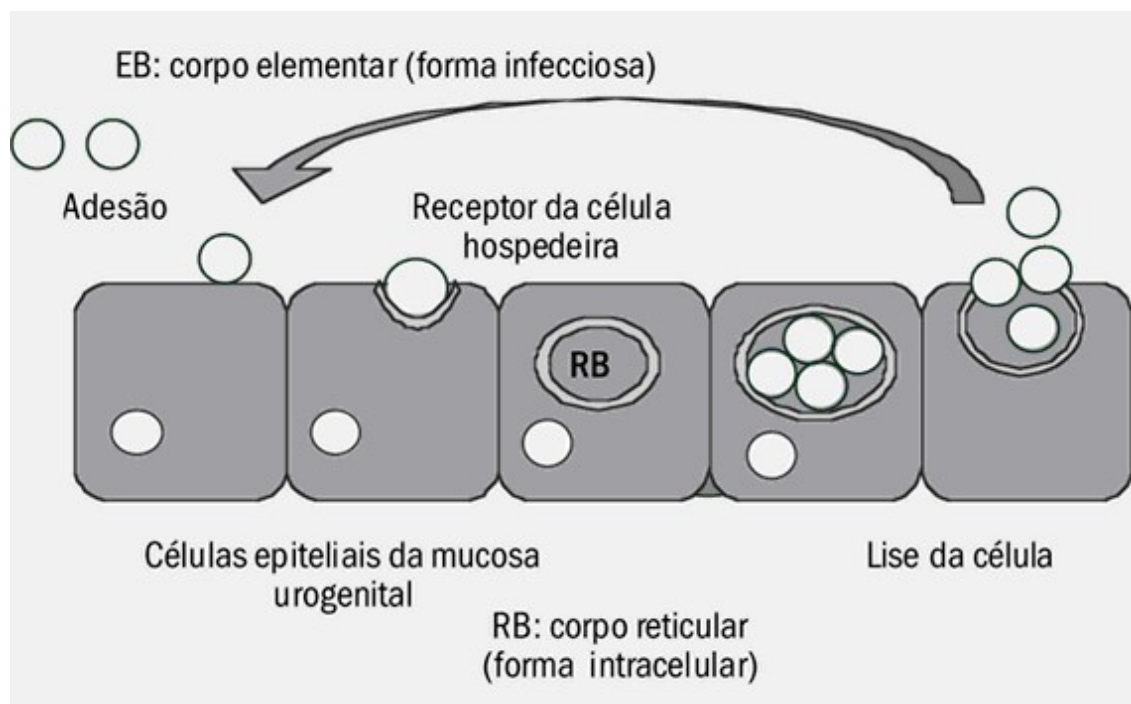


Figura 2: Ciclo biológico da *Chlamydia trachomatis*.

Fonte: www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-2444200200009

1.3.3. Epidemiologia da infecção pela *Chlamydia trachomatis*

A infecção por *Chlamydia trachomatis* apresenta altas taxas de prevalência no mundo e representa um grande problema de saúde pública, sendo

considerada a maior causa de morbidade em indivíduos sexualmente ativos, com uma estimativa de 89 milhões de novos casos ocorrendo anualmente em todo o mundo, sendo que indivíduos não tratados servem com reservatório para a transmissão da infecção aos parceiros sexuais (Vincelle et al., 1999; Golijow et al., 2005).

Esta infecção pode ser persistente devido às muitas estratégias de evasão ao sistema imune do hospedeiro, seja aumentando sua sobrevivência dentro e fora da célula, seja reduzindo a resposta imune adaptativa (Brunham & Rey-Ladino, 2005). O maior impacto da infecção por clamídia ocorre no sistema reprodutivo das mulheres (Kjaer et al., 2000; Da Ros & Schmitt, 2008). A recorrência das infecções é comum, especialmente nos indivíduos que se infectam antes dos 20 anos e a imunidade desenvolvida é parcialmente protetora (Seadi et al., 2002).

A infecção por *C. trachomatis*, é assintomática em mais de 70% das mulheres infectadas, mas quando sintomática, pode haver corrimento vaginal, disúria e sangramento após as relações sexuais (Navarro et al., 2002; Seadi et al., 2002). A infecção por *C. trachomatis*, pode resultar em uretrite, cervicite, endometrite, salpingites agudas ou outras síndromes (Seadi et al., 2002).

As infecções por *C. trachomatis* não tratadas podem levar ao desenvolvimento de doença inflamatória pélvica (DIP) em 10% a 40% das mulheres infectadas, podendo resultar em infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica (Navarro et al., 2002). Além disto, esta infecção genital pode provocar inflamação crônica, dano ao tecido epitelial e tem sido clinicamente

associada a alterações em esfregaços cervicais e indução de metaplasia (Smith et al., 2004).

Semelhante a outras ISTs, as taxas de incidência e prevalência da infecção por *C. trachomatis* são heterogêneas, variando dentre 12,2% e 15,4% (Da Ros & Schmitt, 2008). No Brasil, estudos têm encontrado prevalência de 11,4% a 16% em mulheres jovens (Codes et al., 2002; Miranda et al., 2004). No estudo conduzido por Araújo et al., (2006) a prevalência da infecção em adolescentes e mulheres jovens de Goiânia entre 2000 e 2001, foi de 19,6%. No estudo de Guimarães et al., (2009), conduzido entre 2002 e 2003, e realizado considerando a mesma região mas incluindo apenas adolescentes, a prevalência de *C. trachomatis* foi de 14,5%.

1.3.3. Diagnóstico da infecção pela *C. trachomatis*

O diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* pode ser realizado por diferentes técnicas de detecção direta em amostra clínica. Uma coleta adequada é essencial e se relaciona diretamente com a sensibilidade e a especificidade do teste diagnóstico (Seadi et al., 2002).

As técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos mais comuns são a fixação do complemento, a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático heterogêneo, detectam anticorpos contra o antígeno LPS presente nos corpos elementares ou reticulares (Shacheter et al., 1999). A sorologia é recomendada para estudos epidemiológicos e infecções sistêmicas, porém, não é recomendada para o diagnóstico de infecções urogenitais devido à frequência de exposição aos sorotipos da *C. trachomatis* e pela ocorrência de

reações cruzadas com outras espécies, especialmente a *C. pneumoniae* (Seadi et al., 2002).

1.3.3.1. Cultura em células

A cultura em células pode ser feita em várias linhagens celulares, sendo mais utilizadas as células McCoy distribuídas em monocamadas sobre microplacas. Para verificar a positividade do teste, através da presença de inclusões citoplasmáticas constituída de RB e EB, cora-se o tecido cultivado com anticorpo monoclonal fluorescente. Apresenta como vantagem, alta especificidade (100%) com baixa probabilidade de contaminação e a preservação do microrganismo para estudos adicionais. Sua sensibilidade varia de 70 a 85% (Seadi et al., 2002). Apresenta como desvantagem a necessidade de infraestrutura de laboratório muito onerosa, é trabalhosa e exige cuidados na conservação da amostra (Black, 1997).

1.3.3.2. Diagnóstico Sorológico

A detecção direta de antígenos pode ser realizada pela imunofluorescência direta (IFD) que avalia ao mesmo tempo a adequação da amostra e a presença de antígenos MOMP e LPS utilizando anticorpos monoclonais fluorescentes. Apresenta sensibilidade entre 62% a 75% e especificidade maior que 99% em relação à cultura, quando ambas são realizadas em condições ótimas. Apresenta como desvantagem, a necessidade de pessoal treinado para interpretar os resultados (Black, 1997).

Outra técnica de detecção direta de antígenos é o teste de enzima imunoensaio (EIE) que emprega anticorpos policlonais ou monoclonais para detectar o antígeno LPS da *C. trachomatis* sendo esta sua maior desvantagem, já que há a possibilidade de reação cruzada com outras bactérias (Weinstock et al., 1994). O EIE apresenta sensibilidade menor do que a cultura, alguns EIE utilizam anticorpo bloqueador para re-testar amostras positivas, melhorando a especificidade (99,5%) do teste (Weinstock et al., 1994).

Na pesquisa de anticorpos é freqüente a detecção de anticorpos gêneros-específicos, ou seja, contra o antígeno LPS presentes nos corpos reticulares ou elementares (Shacheter et al., 1999). O título de anticorpos da classe de imunoglobulinas IgG determinado em uma única amostra não discrimina infecção passada de infecção recente, além da possibilidade de reação cruzada com outras espécies de Clamídia, especialmente *C. pneumoniae*. Porém, testes mais recentes têm sido desenvolvidos utilizando peptídeos sintéticos derivados do domínio variável da maior proteína de membrana (MOMP) de *C. trachomatis*. Isto permite a triagem e o diagnóstico de infecções por *C. trachomatis* sem interferência de anticorpos contra *Chlamydia pneumoniae* (Verkooyen et al., 2002). Quando a prevalência de anticorpos na população é alta, o diagnóstico sorológico de infecção recente é difícil (Shacheter et al., 1999).

A microimunofluorescência (MIF) é espécie e subespécie-específica e é a técnica de escolha para a pesquisa do anticorpo IgM no diagnóstico de pneumonia por Clamídia no recém-nascido. É a mais sensível entre as técnicas sorológicas, mas, é laboriosa e de alto custo (Shacheter et al., 1999).

1.3.3.3. Diagnóstico Molecular

A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por Clamídia, por ser mais rápida e sensível e por não depender da viabilidade da amostra (Seadi et al., 2002). A tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos foi o mais importante avanço no diagnóstico de *C. trachomatis* desde que a técnica de cultura de células substituiu a técnica de isolamento a partir de amostras clínicas (Kritski et al., 1997). Este método favorece a detecção de pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas com rapidez e permite a identificação de indivíduos infectados assintomáticos através de coletas por técnicas não invasivas (Kritski et al., 1997). A especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR dependem dos *primers* utilizados, da técnica de referência, do tipo de material, da população a ser analisada, da preparação da amostra e do método de detecção do produto amplificado (Seadi et al., 2002). Sua sensibilidade é 20% maior que os testes de IFD e EIE (Kritski et al., 1997).

No diagnóstico laboratorial de rotina, são utilizados métodos moleculares como, PCR ou hibridização de ácidos nucleicos. A captura híbrida 2 (CH2) é um teste de hibridização que se baseia na detecção do gene *omp1* bem como do plasmídio críptico (Quint et. al., 2007). Os métodos de detecção de ácidos nucleicos têm como alvo as sequências gênicas da MOMP, do plasmídio críptico, ou do rRNA de *C. trachomatis*. (Black, 1997). Há três testes comerciais, aprovados pelo FDA: a reação em cadeia da polimerase (PCR- Roche), com sensibilidade de 90% e especificidade entre 96 a 100%. Reação em cadeia da ligase (LCR- Abbott), que apresenta sensibilidade de 87% e especificidade de 99

a 100%, atualmente, não está disponível no mercado. E por fim, a reação de amplificação mediada pela transcrição (TMA- Gen Probe), que apresenta especificidade maior que 99%. O PCR e a LCR amplificam uma sequência de nucleotídeos do plasmídio da *C. trachomatis*, que está presente em múltiplas cópias em cada EB do microrganismo. O TMA é dirigido ao rRNA também presente em múltiplas cópias (Caliendo 1998; Seadi et al., 2002).

A CH2 é um ensaio de hibridização baseado em sonda de RNA e na amplificação do sinal de detecção. A sonda de RNA é homóloga à sequência completa do plasmídio críptico da *C. trachomatis* e a aproximadamente 39000pb do genoma da *C. trachomatis* (Girdner et al., 1999). A sensibilidade do teste de CH2 para *C. trachomatis* varia de 95,4% a 97,2% frente à cultura e PCR e a especificidade é superior a 99% em amostras endocervicais (Girdner et al., 1999). Apresenta como vantagem o fato de dispensar a separação da área de trabalho e simplificar os aparelhos utilizados (Girdner et al., 1999)

Por fim, a técnica de hibridização de ácidos nucléicos 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 iluminômetro (Hall, 1997). Apresenta sensibilidade mais elevada que a cultura com a vantagem de permitir a detecção de *Neisseria gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (Dores et al., 1999).

1.3.4. Vacinas contra a infecção por *Chlamydia trachomatis*

O desenvolvimento de uma vacina profilática ou terapêutica capaz de proteger contra a infecção ou ao menos melhorar as doenças graves continua sendo a mais promissora estratégia eficaz para controle da *C. trachomatis* que constituem um enorme problema de saúde pública devido à significativa morbidade em todo o mundo (Igietseme et al., 2002; Igietseme et al., 2003). A recorrência das infecções é comum, especialmente nos indivíduos que se infectam antes dos 20 anos, e a imunidade desenvolvida é parcialmente protetora. Episódios sucessivos de infecção aumentam o risco de se desenvolver sequelas e a chance de se contrair a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Curta et al., 2008).

Os desafios no desenvolvimento de uma vacina contra a *C. trachomatis* inclui a identificação dentre os elementos protetores da imunidade, um candidato adequado à vacina, capaz de induzir imunidade protetora e o desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva contra uma subunidade potencial do antígeno (Igietseme et al., 2003).

Progressos na imunobiologia funcional da *C. trachomatis*, estabeleceram os paradigmas imunológicos essenciais para a seleção e avaliação de vacinas, como a exigência de uma vacina capaz de induzir uma resposta T helper 1 que controla as clamídias (Igietseme et al., 2003). Os avanços na imunologia molecular e na biotecnologia nas últimas décadas, levou a mudança nas vacinas constituídas de patógenos inativados, ou vivos atenuados, para vacinas de subunidades. Assim, o desenvolvimento de vacinas baseadas em componentes de subunidade clamidial é o foco atual da concepção de uma vacina

para *Chlamydia* constituindo a proteína maior da membrana externa (MOMP) um dos principais alvos destas vacinas. Esta proteína de 40 kDa imunodominante, tem sido bem caracterizada como uma porina, uma adesina e um fator determinante dos gêneros e especificidades das espécies de *Chlamydia trachomatis* (Igjietseme et al., 2003).

A MOMP induz resposta protetora através de resposta imune humoral e celular. Além disso, os anticorpos monoclonais anti-MOMP oferecem a capacidade para neutralizar a infectabilidade da bactéria. A fim de estimular as respostas imunes geradas pela vacina de DNA cromossomal que codifica MOMP foi utilizado um complexo imune-estimulante de MOMP (ISCOM) em ratos, obtendo-se deste modo uma resposta imune mais forte. Isso foi correlacionado com uma redução significativa do número inclusões bacterianas nos pulmões de ratos. Infelizmente, o efeito protetor desse tipo de vacinação não foi observado nos modelos de infecção genital (Curta et al., 2008).

Os antígenos clamidiais em infecções humanas são sorologicamente definidos e molecularmente caracterizados (Brunham & Peleing 1994; Jones et al., 1996; Ward 1992) e avanços recentes no genoma clamidial apontam várias proteínas imunogênicas (Read et al., 2000; Stephens, 2000) que podem servir como candidatas a vacina como as OMPs polimórficas (Longbottom et al., 1998; Grimwood et al., 2001; Niessner et al., 2003) e as proteínas de membrana conservadas da família PorB (Kubo & Stephens 2000; Kawa & Stephens 2002) e a ADP/ATP translocase da *C. trachomatis* (Read et al., 2006). Potenciais candidatos para a vacina no complexo MOMP incluem as proteínas da membrana externa (OMP) ricas em cisteína, OMP2 (60kDa) e OMP3 (15kDa) (Hatch et al., 1984). A síntese e a incorporação da OMP2 e OMP3 coincidem com a transição

do corpo reticular (RB) para corpo elementar (EB) no ciclo de desenvolvimento (Newhall, 1987). Apesar da OMP2 apresentar 5 regiões diferentes, ela é bem conservada dentro de uma espécie de *Chlamydia* (Hanuka et al., 1988; Wagar et al., 1990; Watson et al., 1991; Wagels, et al., 1994) e tem mostrado ser um antígeno altamente imunoreativo, induzindo respostas tanto em humanos como em animais (Wagels, et al., 1994; Watson, et al., 1994; Mygind et al., 1998).

No entanto, o desenvolvimento de um sistema eficaz que é a chave para mudança na vacina chlamydial não tem recebido atenção adequada.

1.4. A associação HPV e *C. trachomatis*

Existe forte evidência epidemiológica que sugere que HPV e *Chlamydia trachomatis* desempenham um papel central na etiologia da neoplasia intraepitelial cervical e subsequentemente no carcinoma cervical (Bulkmans et al, 2005). A forma de transmissão similar e fatores de risco comuns como idade, do início da atividade sexual e múltiplos parceiros (Navarro et al., 2002; Matsumoto et al., 2003; Rosa et al., 2009), tem estimulado o desenvolvimento de vários estudos com o objetivo de avaliar o efeito da infecção passada por HPV e *Chlamydia trachomatis* e o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) (Tamim et al, 2002). Existem indicações de que a *C. trachomatis* pode facilitar a infecção por HPV, facilitando a persistência viral estando associada à gravidade da neoplasia cervical (Matsumoto et al., 2003; Anttila et al., 2001; Koskela et al., 2000).

A taxa de positividade para HPV e soropositividade para *C. trachomatis* em um estudo com adolescentes realizado em Goiânia, foi de 19% (23/121).

Contudo, a prevalência da infecção pela *C. trachomatis*, não mostrou associação com a infecção pelo HPV (Alves, 2006). Por outro lado, vários estudos tem demonstrado que há associação entre a positividade para o HPV e *C. trachomatis*. Verteramo et al. (2009) observaram um aumento na taxa de infecção pela *C. trachomatis* em mulheres positivas para o HPV, especialmente para os tipo de alto risco oncogênico pelo fato de causar microabrasões ou alterações nas células epiteliais, facilitando assim, a entrada de vírions. Golijow et al., (2005) também encontraram uma alta prevalência de HPV de alto risco em mulheres *C. trachomatis* positivas. De forma semelhante, Finan et al (2002) também observaram essa associação.

Infecções simultâneas por *C. trachomatis* e HPV têm sido relacionadas com alta expressão de Ki 67, um marcador de proliferação celular presente no núcleo de células em fase de multiplicação, no epitélio. A infecção por *C. trachomatis* também aumenta a expressão de HPV16 nas NIC 1 o que pode indicar que esta infecção modifica a atividade do vírus. Além disto, a infecção por *C. trachomatis* 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 (Barros et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado que a taxa de infecção por *C. trachomatis* é maior em mulheres HPV positivas e esta co-infecção está relacionada com maior risco de lesões cervicais, demonstrando mais uma vez que a infecção por *C. trachomatis* tem estreita relação com o HPV no desenvolvimento do câncer cervical (Barros et al., 2007). Muñoz et al., (2006) acredita que pelo fato de serem infecções relacionadas com o comportamento sexual elas atuem em

conjunto nas alterações no colo uterino. Fischer (2002) observou que a infecção pela *C. trachomatis* amplifica a expressão das oncoproteínas virais já que a presença da *C. trachomatis* aumentou a expressão do HPV em mulheres com NIC e carcinoma invasivo. Tamin et al., (2002) e Anttila et al., (2001) de forma semelhante, observaram que a infecção pela *Chlamydia trachomatis* em mulheres HPV positivas mostrou-se fortemente associada com alterações no colo do útero..

1.5. JUSTIFICATIVA

Um melhor conhecimento dos padrões de infecção por tipos específicos de HPV e sua relação com a soropositividade para *C. trachomatis* pode significar um avanço na compreensão da história natural da infecção e sua relação com lesões neoplásicas escamosas intra-epiteliais e invasoras. Além disto, propiciar o conhecimento do perfil epidemiológico das infecções por HPV nas diferentes lesões histologicamente diagnosticadas é de fundamental importância. Diante do exposto, interessa analisar a prevalência das infecções por tipos específicos de HPV e as associações entre as mesmas e soropositividade para *C. trachomatis* em mulheres portadoras de neoplasias cervicais.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a soropositividade de *C. trachomatis* em mulheres HPV positivas associando com a gravidade do diagnóstico de neoplasia cervical em uma área central do Brasil

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1 Detectar a prevalência total de HPV e a soropositividade para *Chlamydia trachomatis* em mulheres com exame citopatológico alterado.
- 2.2.2. Correlacionar os tipos específicos e a soropositividade para *C.trachomatis* com o diagnóstico histopatológico.
- 2.2.3. Avaliar a associação entre a soropositividade para *C. trachomatis* em mulheres HPV positivas e a gravidade da neoplasia cervical.
- 2.2.4. Avaliar a associação entre a soropositividade para *C. trachomatis* em mulheres positivas para tipos específicos de HPV e a severidade da neoplasia cervical.

3. PUBLICAÇÃO

Artigo

Association of HPV infection and *Chlamydia trachomatis* seropositivity in cases of cervical neoplasia in woman of Midwest Brazil

Associação da infecção pelo HPV e soropositividade para *Chlamydia trachomatis* em mulheres com neoplasia cervical de uma região central , Brasil.

Autores

Narriman Kennia da Silva Barros, Luísa Lina Villa, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves, Maria Cecília Costa, Sophie Françoise Mauricette Derchain, Luiz Carlos Zeferino, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, Silvia Helena Rabelo-Santos.

Artigo a ser submetido à **Gynecologic Oncology**

Association of HPV infection and *Chlamydia trachomatis* seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil

Narriman Kennia da Silva Barros¹, Luísa Lina Villa², Rosane Ribeiro Figueiredo Alves^{3,4}, Maria Cecília Costa ², Sophie Françoise Mauricette Derchain⁵, Luiz Carlos Zeferino⁵, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro⁶, Silvia Helena Rabelo-Santos¹.

¹ School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

² Ludwig Institute of Cancer Research, São Paulo Branch, São Paulo, SP, Brazil;

³ Santa Casa de Misericórdia, Goiânia, GO, Brazil;

⁴ Catholic University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

⁵ Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil;

⁶ Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

***Financial Support:** National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), grant # 479303/2006-1.

Corresponding author:

Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Faculdade de Farmácia – UFG

1^a avenida S/N, setor universitário

74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

Telefone: +55 62 3209-6457; Fax: + 55 62 3209-6044

E-mail: silvia.rabelo@pesquisador.cnpq.br

Abstract

Objective: To evaluate the association seropositivity for *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) in HPV-positive women and to correlate specific HPV genotypes with the severity of cervical neoplasia. **Methods:** The study included 131 women referred to a colposcopy clinic in Goiás, Brazil because of an abnormal cervical smear. HPV DNA was detected by polymerase chain reaction using PGMY09/PGMY11 primers, and genotyping was performed by reverse line-blot hybridization assay. *C. trachomatis* seropositivity was evaluated using ELISA for the detection of IgG antibodies. **Results:** The total prevalence of HPV infection was 86.3% (113/131). Seropositivity for *C. trachomatis* was 26% (34/131). Thirty-one women (27.4%; 31/113) tested seropositive for both *C. trachomatis* and HPV. Of these, 12.9% (4/31) had negative histology, while 87.1% (27/31) were positive for neoplasia. The most prevalent HPV type in *C. trachomatis* -seropositive women was HPV 16 (51.6%; 16/31) and this HPV type was present principally when neoplasia was diagnosed. Positivity for HPV, particularly HPV types 16 and 18, and *C. trachomatis* was significantly associated with a diagnosis of high grade neoplasia (\geq CIN 2) when cases that were HPV/*C. trachomatis*-negative were taken as a reference. Borderline significance was observed when the reference was HPV-positive and *C. trachomatis*-seronegative cases. Borderline significance was also found between positivity for other types of HPV, positivity for *C. trachomatis*, and a diagnosis of neoplasia when HPV/ *C. trachomatis*-negative cases were considered as a reference. **Conclusions:** *C. trachomatis* seropositivity was associated with high grade neoplasia in HPV-positive women, principally when HPV types 16 and 18 were involved.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; HPV; cervical intraepithelial neoplasia, squamous cell carcinoma, cervical smear, PCR, serology.

Introduction

Cervical cancer evolves from preexisting noninvasive premalignant lesions referred to as cervical intraepithelial neoplasias (CIN) [1]. High-risk papillomavirus (HPV) is considered the main etiological agent for cervical neoplasia. However, the presence of a single type HPV infection alone is unlikely to be sufficient to provoke cervical carcinogenesis, and it is assumed that other sexually transmitted infections may contribute to an increased risk of cervical neoplasia [2].

There is epidemiologic evidence suggesting that human papillomaviruses and *C. trachomatis* play a central role in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia and subsequent cervical cancer [3]. However, the exact relationship between *C. trachomatis* and HPV infection remains to be clarified. It is possible that *C. trachomatis* infection may be an independent or coexisting factor for HPV in the development of invasive cervical carcinoma (ICC) [3].

C. trachomatis infection may increase susceptibility to HPV by causing micro-abrasions or alterations in epithelial cells, thus facilitating the entry of virions. In addition, some reports have suggested that a concurrent *C. trachomatis* infection may reduce the host's ability to resolve the HPV infection [4]. In fact, *C. trachomatis* induces a shift in the immune response and unresolved *C. trachomatis* infections have been associated with a humoral immune response, whereas cellular immune response is important for the clearance of HPV lesions. Therefore, the modulation of cervical immune response by *C. trachomatis* may affect the clearance of HPV lesions [5].

Chronic cervical inflammation seems to affect the persistence of HPV infection by increasing the production of free radicals [4]. Moreover, cells infected

by *C. trachomatis* secrete a higher amount of cytokines, resulting in a more intense inflammatory state [6].

Studies have shown a higher rate of *C. trachomatis* infection in HPV-positive patients [3, 4] and this association appears to increase the risk of CIN and cervical cancer [2, 3, 7-9]. According to Paba et al. [10], the ability of women with *C. trachomatis* to clear HPV seems to be impaired, favoring persistence of the infection, which is an essential step towards the development of high-grade CIN and invasive cancer. Golijow et al. [2] observed that the prevalence of both HPV and *C. trachomatis* -DNA increased with the increasing severity of cervical neoplasia, and *C. trachomatis* -DNA-positive women appeared to have a higher risk of both LSIL and HSIL lesions after controlling for age and HPV-positivity. However, other studies have failed to find any association between HPV/ *C. trachomatis* and the severity of cervical neoplasia. Reesink-Peters et al. [11] reported that the prevalence of antichlamydial antibodies did not increase significantly as a function of the increasing severity of CIN. Luostarinen et al. analyzed the joint effects of different human papillomavirus and *C. trachomatis* infections on the risk of squamous cell carcinoma of the cervix and reported an antagonistic interaction between HPV 16 and *C. trachomatis*. [12].

In view of these controversies, this study was designed to evaluate seropositivity for *C. trachomatis* in HPV-positive women referred to colposcopy due to an abnormal cervical smear, and to analyze the effect of this association on the diagnosis and severity of cervical neoplasia.

Subjects and methods:***Study subjects and sampling:***

Between February 2007 and March 2009, a series of 189 women aged 14-68 years referred to a colposcopy clinic because of cytological abnormalities detected at their referral smear were included in this study. After signing an informed consent form, all participating women completed a standard questionnaire with information regarding their age, smoking habits, age at first sexual intercourse, number of lifetime sexual partners, oral contraceptive use and number of pregnancies.

Following enrollment, all patients underwent colposcopy, and a second cervical smear with endocervical sampling was carried out at the first study visit. The residual material was rinsed and stored in 1.0mL of Universal Collection Medium (*QUIAGEN Sample & Assay Technologies*) or HPV DNA testing. Blood samples were collected from each study participant for the detection of anti-CT IgG antibodies.

Punch biopsy was performed whenever a suspicious colposcopic image with complete visualization was identified. Women with a diagnosis of CIN1 were scheduled to return for follow-up visits every 6 months, while women with a diagnosis of CIN2 or CIN3 were submitted to cervical conization/hysterectomy and those with a diagnosis of cervical cancer were referred for specialized treatment. Women with a suspicious image penetrating the cervical canal and those in whom colposcopy findings were unsatisfactory and in addition had an abnormal repeat cervical smear were submitted to cervical conization.

Of the 189 women admitted to the study, final outcomes and HPV/CT test results were available for analysis in 131 cases. Of these, histology was performed in 127 cases. In the remaining 4 women, colposcopy was negative and a repeat cervical smear was also negative; therefore, these women were considered negative in the final diagnosis and were scheduled to return for follow-up visits every 6 months. At the cut-off point for data analysis, the mean duration of follow-up in these cases was two years. These women were analyzed together with women for whom histology resulted in a diagnosis of cervicitis/CIN1.

Human papillomavirus DNA detection and typing:

Aliquots of 200 μ L of Universal Collection Medium were taken for polymerase chain reaction (PCR) testing and centrifuged for 10 minutes at 13,000 x g. The supernatants were immediately removed and split cellular pellets stored at - 80°C before nucleic acid extraction. The cellular pellets were resuspended in 200 μ L of digestion solution (1mM Tris, 200 μ g of proteinase K/mL, 0.5% sodium dodecyl sulfate) and digested at 55°C for 2 hours. The digestion was followed by a 5-minute incubation at 95°C to inactivate proteinase K. Nucleic acids were purified by phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation. The DNA pellet was dried and dissolved in 100 μ L of TE (10nM Tris, 1mM EDTA) (1X). Nucleic acids were stored at - 80°C prior to HPV detection.

HPV-DNA genotyping was carried out using a reverse line-blot hybridization assay which involved the hybridization of a 450-nt PCR amplicon, generated by the PGM1 primer, set to a nylon strip containing immobilized probes [13, 14]. The strip contained 2 levels of β -globin control probes, 18 high risk HPV

probes (HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82 and 83) and 9 low-risk HPV probes (LR-HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66 and 84). PCR reagents, probe strips and developing reagents were kindly supplied by Roche Molecular Systems Inc. (Pleasanton, CA, USA). The 100 μ L of amplification mixture contained 4mM of $MgCl_2$, 50mM of KCl, 7.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), 200 μ M each of dATP, dCTP and dGTP, 600 μ M of dUTP, 100 pmol of each biotinylated PGMY09/PGMY11 primer pool and 2.5 pmol each of 50 biotinylated β -globin primers, GH20 and PCO4. The following ultrasensitive amplification profile was used: activation of AmpliTaq Gold for 9 minutes at 95°C, denaturation for 1 minute at 95°C, annealing for 1 minute at 55°C, extension at 72°C for 1 minute for a total of 40 cycles, followed by a 5-minute terminal extension step at 72°C. Agarose gel electrophoresis was carried out to identify HPV-DNA-positive specimens before strip development.

Amplicons were denatured in 0.4N NaOH and 40 μ L of the denatured product was reacted in 3mL of hybridization buffer with a reverse line-blot containing HPV genotypes and β -globin probe at 2 concentrations immobilized on nylon strips. Positive hybridization was detected by streptavidin-horseradish peroxidase-mediated color precipitation on the membrane at the probe line. In specimens considered HPV-negative, the 2 globin lines (high and low copies) appeared at levels comparable to those of positive controls; otherwise they were repeated until the criteria for globin positivity was reached.

Serology for *Chlamydia trachomatis*:

Serum IgG antibody responses to *C. trachomatis* were determined by a serological enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), (Symbiosis Diagnóstica Ltda, Leme, SP, Brazil), using synthetic peptides derived from the major outer membrane protein (MOMP) variable domain. This feature allows the screening and diagnosis of *C. trachomatis* infections to be performed without interference from the antibodies against *Chlamydia pneumoniae*. The assay was carried out according to the manufacturer's instructions. The results were based on optical density (OD) measurements and the cut-off OD value. Absorbance was determined using a bichromatic spectrophotometer set at 450 nm, calibrated with a blank solution at the wavelength range of 620-630nm. All measurements were performed within 10 minutes of calibration.

Samples with index values ≥ 1.1 were considered positive, while sample index values < 0.9 were considered negative. Samples with index values between 0.9 and 1.1 were considered inconclusive and in these cases the tests were repeated.

Histopathology

Biopsy specimens were stained with hematoxylin and eosin (HE), reviewed according to the World Health Organization (WHO) criteria [15] and classified as: CIN 1, CIN 2, CIN 3, invasive squamous carcinoma or invasive cervical adenocarcinoma. All the histological analyses were carried out in a pathology laboratory and in all cases diagnosis was made by the same pathologist, who was blinded to the cytological diagnoses.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the SAS statistical software program, version 8.0. Data were expressed as percentages of the total or as a frequency of HPV-positive and *C. trachomatis*-seropositive cases. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* and HPV DNA types was compared in each group of cervical neoplasia diagnoses using the chi-square test with Yates' correction. The association between specific HPV genotypes, *C. trachomatis* seropositivity and final diagnosis was calculated using odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (95%CI). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Results

HPV was detected in 86.3% of valid specimens (113/131). Single infections represented 50.4% of cases (57/113), multiple infections occurring in 49.6% of all cases (56/113). Seropositivity for *C. trachomatis* was 26% (34/131). The prevalence of HPV/*C. trachomatis* co-infection was 27.4% (31/113). *C. trachomatis* seropositivity was higher in HPV-positive women, but this difference was not statistically significant (Table 1).

Considering final outcomes, the total prevalence of HPV was 62.5% (15/24) in women with negative histology, 88.7% (47/49) in women diagnosed with CIN1, 91.7% (22/24) in women with CIN2, 96% (24/25) in women with CIN3 and 100% (3/3) in cases of invasive carcinoma. With respect to *C. trachomatis* infection, overall prevalence was 20.8% in women with negative histology, 18.8% in women with CIN1, 33.3% in women with CIN2, 32% in women with CIN3 and

60% in women with a diagnosis of invasive carcinoma. With respect to the HPV-positive women, irrespective of whether the infection was single or multiple-type, 11 different HPV types were found in the 15 cases negative for neoplasia, 28 different types in the 47 cases of CIN1, 18 different types in the 22 cases of CIN2, 15 different types in the 24 cases of CIN3 and only one type in the 5 cases of invasive carcinoma. Type 16 was the most prevalent HPV infection in all diagnoses, whether as a single or multiple-type infection (35.9%; 47/131). HPV 31 (9.9%; 13/131) and 35 (9.2%; 12/131) were the second and third most prevalent types irrespective of whether the HPV infection was a single or multiple infection. The total prevalence of HPV 18 as a single or multiple infection was 6.1% (8/131), constituting the fourth most prevalent type (Table 2).

Thirty-one women (27.43%; 31/113) tested positive for *C. trachomatis* and HPV simultaneously, and in 96.8% of these cases (30/31) the infection included a high-risk oncogenic HPV type. In the *C. trachomatis*-seropositive women, 61.3% (19/31) of the HPV infections were single infections, while 38.7% (12/31) were multiple infections. The most prevalent HPV type in the *C. trachomatis* - seropositive women was HPV 16 (51.61%; 16/31) and in these women, this type was present in 50% (2/4) of histologically negative cases, in 33.3% (3/9) of cases of CIN1, 62.5% (5/8) of cases diagnosed as CIN2, 42.9% (3/7) of CIN3 and 100% (3/3) of cases of invasive carcinoma. The second most prevalent HPV type was HPV35 (13%; 4/31), followed by HPV18 and HPV52, both with 6.4% (2/31) (Table 3).

Taking HPV and *C. trachomatis*-negative cases as a reference, positivity for HPV/*C. trachomatis* was significantly associated with a diagnosis of

CIN 2 or worse (OR: 8.00; 95%CI: 1.31 - 62.62; $p = 0.007$); however, no such association was found when HPV-positive cases were taken as a reference (OR: 1.83; 95%CI: 0.72 - 4.69; $p = 0.16$). A diagnosis of neoplasia was significantly associated with HPV16 and/or HPV18 as a single or multiple infection and with seropositivity for *C. trachomatis* when HPV/*C. trachomatis*-negative cases were taken as a reference (OR: 13.00; 95%CI: 1.78 - 121.37; $p = 0.002$). In addition, borderline significance ($p = 0.041$) was observed when HPV-positive and *C. trachomatis*-seronegative cases were taken as reference (OR: 2.97; 95%CI: 0.91 – 9.99; $p = 0.041$). Moreover, borderline significance was also found between other HPV types and seropositivity for *C. trachomatis* and a diagnosis of neoplasia when HPV/*C. trachomatis*-negative cases were considered as reference (OR: 6.5; 95%CI: 0.78–66.96; $p = 0.038$). No association was found when the reference considered was HPV-positive/*C. trachomatis*-negative cases (OR: 1.48; 95%CI: 0.38 - 5.80; $p = 0.52$) (Table 4).

Discussion

C. trachomatis-seropositivity was associated with the severity of cervical neoplasia in HPV-positive women, principally when HPV types 16 and 18 were involved. In fact, diagnoses of neoplasia are more common than a diagnosis of non-neoplasia in women who test positive for HPV and *C. trachomatis*. In addition, HPV-positivity, particularly when HPV types 16 and 18 are involved, and seropositivity for *C. trachomatis* were factors significantly associated with a diagnosis of high-grade neoplasia. Therefore, it may be important to screen HPV-positive women for the simultaneous presence of *C. trachomatis* bearing in mind that this association may have synergistic pathological effects.

A positive association between *C. trachomatis*, HPV and the detection of cervical neoplasia or invasive cervical cancer has been found in studies in which *C. trachomatis* positivity was assessed by serology or DNA detection [2, 3, 8]. Detection of *C. trachomatis* serum antibodies rather than DNA is likely to be a better measure of cumulative exposure to *C. trachomatis* or of exposure occurring several years prior to the development of cervical disease [2]. Smith et al. evaluated *Chlamydia trachomatis* infection as a cause of invasive cervical cancer and observed that *C. trachomatis* increased the risk of squamous cervical cancer in HPV-positive women (odds ratio 2.1; 95%CI: 1.1 - 4.0) [8]. Matsumoto et al. found *C. trachomatis* infection to be a significant cofactor for CIN development after adjustment for HPV antibody positivity [16].

The overall prevalence of HPV infection was 86.3%. This is similar to the findings of Zuna et al. [17], who reported a prevalence of 97.1% in women with high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma. Paba et al. detected HPV in 91.2% of women with CIN and cervical cancer [10]. This high prevalence is explained by the fact that this present study was conducted in an opportunistic setting in a tertiary hospital that receives a mixed population of women, some of whom are self-referred, whereas others are referred by their healthcare providers for specialist care. Because these women were symptomatic, a higher prevalence of HPV DNA positivity and of CIN was expected.

Several studies have shown that *C. trachomatis* positivity is more common in HPV-positive women; however, controversies remain with respect to the significance of this association. An important aspect to consider in this approach is that concurrent infection with *C. trachomatis* may impede clearance of

HPV by inducing a shift in the immune response to the HPV infection. Cellular immune responses have been shown to be important in the clearance of HPV lesions [18]. An unresolved *C. trachomatis* infection has been associated with a humoral immune response and inflammatory infiltrates [19, 20]. Therefore, modulation of the cervical immune response toward a T-helper cell type 2 response may be a *C. trachomatis*-specific effect that facilitates the persistence of HPV.

In this study, seropositivity for *C. trachomatis* was more common in HPV-positive women, although this difference was not statistically significant. These data are consistent with findings reported from previous studies. Golijow et al. [2] also observed that the prevalence of *C. trachomatis* infection detected by PCR was slightly higher in HPV-DNA-positive patients (12.5%) compared to HPV-DNA negative women (10.9%); however, this difference also failed to reach statistical significance. Smith et al. [8] observed that neither *C. trachomatis* seropositivity (OR 1.4; 95%CI: 0.7 - 3.7) nor high *C. trachomatis* antibody titers (OR 1.6; 95%CI: 0.7 - 3.7) were significantly associated with HPV DNA detection. On the other hand, Finan et al. [7] found a higher prevalence of *C. trachomatis* in HPV-positive women (47.7%; 21/44) compared to HPV-negative women (14.3%; 11/77) and this difference was statistically significant. Tamin et al. [3] also found *C. trachomatis* infection to be more prevalent in HPV-positive women and this difference was statistically significant (OR 10.2; 95CI %: 4.2 – 24.3).

Antagonistic effects were observed between HPV16 infection, *C. trachomatis* infection and infection by low-risk HPV types in a study conducted by Luostarinen et al. (2004) According to these authors, it is impossible to say to what extent this antagonistic effect was caused by immune reactions, differential

misclassification of exposure or selection bias, or whether it constitutes a true biological phenomenon characterizing an antagonistic interaction between HPV16, HPV6/11 and *C. trachomatis* [12]. In addition, Rosa et al. [21] concluded that the presence of *C. trachomatis* co-infection at baseline appeared to increase the probability of HPV clearance. These authors speculated that infection with *C. trachomatis* may cause immunologic reactions that could somehow assist in the clearance of HPV.

The prevalence of HPV/*C. trachomatis* co-infection found in this study was 27.4% (31/113). Under these circumstances, a diagnosis of neoplasia was more common than a diagnosis of non-neoplasia. Similarly, Paba et al. found a prevalence of HPV/*C. trachomatis* co-infection, as detected by PCR, of 23.5% (32/136) in women with CIN and cervical cancer [10]. In addition, Golijow et al. [2] reported an increase in the prevalence of HPV, principally HPV 16, and *C. trachomatis* positivity as a function of the severity of cervical neoplasia.

Several studies have also shown a higher risk of cervical neoplasia in women with *C. trachomatis* serum seropositivity [7, 16, 22]. Finan et al. [7] showed that HPV and *C. trachomatis* infections are related to CIN diagnosis. Matsumoto et al. [16] reported that *C. trachomatis* infection was a significant cofactor for CIN with an OR of 2.7 (95%CI: 1.3 - 6.0) after adjustment for HPV antibodies, although adjustment was not made for HPV DNA. Anttila et al. [22] observed that in all invasive carcinomas, antibodies measured by ELISA were associated with a higher risk of cervical carcinoma.

Collectively, these data suggest a relationship between HPV and *C. trachomatis* infection in the development of CIN. In fact, the prevalence of both HPV (principally HPV 16) and *C. trachomatis* increased with the increasing

severity of cervical neoplasia in 131 women included in this study. In contrast, Reesink-Peters et al. [11] found no association between anti-*C. trachomatis* antibodies and the severity of cervical neoplasia; however, the prevalence of *C. trachomatis* antibodies was significantly higher in the group of women with invasive carcinoma than in women with CIN. Similarly, in a study conducted in Taiwan, Naucler et al. [9] also failed to find any association between antibodies against *C. trachomatis* and cervical cancer (OR: 1.14; 95%CI: 0.62 - 2.10).

The results of the present study point to the existence of an association between *C. trachomatis* seropositivity and the severity of cervical neoplasia in HPV-positive women, principally when HPV types 16 and 18 are involved. The *Chlamydia trachomatis* infection affects the course of the HPV infection. Evidence points to a possible association with the incidence of invasive cervical cancer by altering cell-cell adhesion and affecting cell differentiation [23]. In addition, the most carcinogenic HPV types are concentrated in species $\alpha 9$ and $\alpha 7$, which include types 16 and 18, respectively. Schiffman et al. reported that persistent HPV 16 infection constitutes a carcinogen with a very high positive predictive value for severe neoplasia [24].

There is some epidemiological evidence, albeit weak, to suggest that inflammation may be linked to cervical cancer, perhaps as an HPV cofactor [25] and may be associated with high-grade lesions in women infected with oncogenic HPV. HPV infection of the cervix is not believed to be inflammatory. Nevertheless, *C. trachomatis* infection secretes higher amounts of cytokines resulting in a severe inflammatory state. In the mechanism of lymphocyte T proliferation, the CT-antigen is recognized by macrophages presenting as lymphocyte T. Macrophages release cytokines – tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1alpha

(IL-1 α). Cytokines induce synthesis of IL-6 by fibroblasts. IL-6 and its specific receptors on keratocytes activate the synthesis of growth factors (transforming growth factor- α , TGF- α , amphiregulin). These factors trigger the autocrine stimulation of keratocytes [26]. Fischer observed that *C. trachomatis* infection causes changes in the fibroblasts of the cervix via IL-1 α activity and TNF- α . These factors are released from macrophages after phagocytosis of Chlamydia [26]. In addition, the inflammation consequent to the *C. trachomatis* infection may lead to chronic cervical tissue injury indirectly resulting from the production of reactive oxygen species, triggering an inflammatory cascade, decreasing cellular immunity and promoting angiogenesis [27].

In summary, the possible potential interaction between *C. trachomatis* and HPV infections merits further evaluation in large prospective studies, particularly in women at a higher risk of incident *C. trachomatis* infections, in order to provide more definitive data concerning the role of this pathogen as an HPV cofactor for cervical carcinogenesis.

References

- [1] Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S25-33.
- [2] Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol* 2005;96:181-6.
- [3] Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:277–81.
- [4] Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, Nicosia R, Chiarini F, Antonelli G, Degener AM. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. *BMC Infect Dis* 2009;9:1–7.
- [5] Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, Papp JR, Black CM, Unger ER. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol* 2005;162:668-75.
- [6] Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:429-34.

[7] Finan RR, Tamim H, Almawi WY. Identification of Chlamydia trachomatis DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. Arch Gynecol Obstet 2002;266:168–71.

[8] Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, Bosch FX, Walboomers JM, Peeling RW. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. J Infect Dis 2002;185:324–31.

[9] Naucler P, Chen HC, Persson K, You SL, Hsieh CY, Sun CA, Dillner J, Chen CJ. Seroprevalence of human papillomaviruses and Chlamydia trachomatis and cervical cancer risk: nested case-control study. J Gen Virol 2007;88:814–22.

[10] Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, Ciotti M. 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. Intervirology 2007;51:230-4.

[11] Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, Van Der Zee AG, Quint WG, Burger MP, Adriaanse AH. No association of anti-Chlamydia trachomatis antibodies and severity of cervical neoplasia. Sex Transm Infect 2001;77:101–2.

[12] Luostarinen T, Lehtinen M, Bjørge T, Abeler V, Hakama M, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Lenner P, Lie AK, Paavonen J, Pukkala E, Saikku P, Sigstad E, Thoresen S, Youngman LD, Dillner J, Hakulinen T. Joint effects of different human papillomaviruses and Chlamydia trachomatis infections on risk of squamous cell carcinoma of the cervix uteri. Eur J Cancer 2004;40:1058-65.

[13] Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998;36:3020-7.

[14] Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357-61.

[15] Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkins EJ. Histological typing of female genital tract tumors. In: World Health Organization. *International Histological Classification of Tumors*. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994. p. 36–49.

[16] Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, Hoshiai H, Taketani Y, Kawana T, Yoshikawa H. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Different results after adjustment for HPV DNA and antibodies. *Br J Cancer* 2003;89:831-3.

[17] Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod Pathol* 2004;17:1314-22.

[18] Stern PL, Brown M, Stacey SN, Kitchener HC, Hampson I, Abdel-Hady ES, Moore JV. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol* 2000;19:57-66.

- [19] Debattista J, Timms P, Allan J, Allan J. Immunopathogenesis of Chlamydia trachomatis infections in women. *Fertil Steril* 2003;79:1273-87.
- [20] Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2003;11:44-55.
- [21] Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:617.e1-7.
- [22] Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Närvänen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001;285:47-51.
- [23] Simonetti AC, Melo JH, de Souza PR, Brunaska D, de Lima Filho JL. Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. *Microbes Infect* 2009;11:435-42.
- [24] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337:76-84.

[25] Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Burk RD, Rodriguez AC, Alfaro M, Hutchinson ML, Morales J, Schiffman M. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1021-7.

[26] Fischer N. Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;23:247-50.

[27] Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzeti MC, Silva FR, Silva BR. [Human papillomavirus and cervical neoplasia]. *Cad Saude Publica* 2009;25:953-64.

Table 1: Total prevalence of HPV and *Chlamydia trachomatis* (CT) infections in women with cervical neoplasia

	HPV- positive	%	HPV - negative	%	Total	%	*Odds ratio (95%CI)	p-value
CT- positive	31	23.7	3	2.3	34	26	1.89 (0.42 - 8.86)	0.333
CT- negative	82	62.6	15	11.4	97	74		
Total	113	86.3	18	13.7	131	100		

*The reference used for the odds ratio was HPV-positive and CT-negative cases.

Table 2: Prevalence of specific HPV types and *C. trachomatis* (CT) positivity in relation to histologic diagnosis.

HPV types	Negative	CIN 1	CIN 2	CIN 3	ISC	AC
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
16	3 (20)	5 (10.64)	4 (18.18)	8 (33.33)	3 (100)	2(100)
18	1 (6.68)	1 (2.13)	-	-	-	-
52	-	1 (2.13)	2 (9.1)	1 (4.17)	-	-
58	-	1 (2.13)	-	-	-	-
53	-	1 (2.13)	-	-	-	-
31	-	3 (6.38)	-	1 (4.17)	-	-
56	-	-	-	1 (4.17)	-	-
69	-	3 (6.38)	-	-	-	-
82	-	1 (2.13)	1(4.54)	-	-	-
35	-	2 (4.25)	-	2 (8.33)	-	-
33	-	-	-	1 (4.17)	-	-
51	2 (13.33)	-	-	-	-	-
66	2 (13.33)	-	-	-	-	-
<i>HPV 16 and HPV18</i>	-	-	-	1 (4.17)	-	-
<i>HPV16 and others</i>	2 (13.33)	10(21.28)	11 (50)	2 (8.33)	-	-
<i>HPV18 and others</i>	-	2 (4.25)	1 (4.54)	-	-	-
<i>HPV31 and others</i>		4 (8.51)	2 (9.1)	1 (4.17)		

<i>HPV35 and others</i>		1 (2.13)	1 (4.54)	1 (4.17)		
<i>Other HPV types</i>	3 (20)	10(21.28)	-	4(16.65)	-	-
Low risk	2 (13.33)	2 (4.25)	-	1 (4.17)	-	-
Total number of HPV-positive cases	15 (100)	47 (100)	22 (100)	24 (100)	3 (100)	2(100)
Total number of HPV-negative cases	9 (37.5)	6 (13.32)	2 (8.33)	1 (40)	0	0
Total number of CT-positive cases	5 (20.83)	10(18.87)	8 (33.33)	8 (32)	2(66.67)	1 (50)
Total number of CT-negative cases	19(79.17)	43(81.13)	16(66.67)	17 (68)	1(33.33)	1 (50)
Total No. cases	24 (100)	49 (100)	24 (100)	25 (100)	3 (100)	2(100)

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; ISC: invasive squamous carcinoma; AC: Adenocarcinoma

Table 3: Prevalence of HPV types in *C. trachomatis* (CT)-seropositive women in relation to histologic diagnosis.

HPV	Negative		CIN1		CIN2		CIN3		Invasive carcinoma		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
16	1	25	2	22.2	1	12.5	2	28.6	3	100	9	29.0
HPV16/			-	-	-	-						
HPV18	-	-					1	14.3	-	-	1	3.2
HPV16/HPV35	-	-	-	-	2	25	-	-	-	-	2	6.4
HPV16/												
others	1	25	1	11.1	2	25	-	-	-	-	4	13
Total	2	50	3	33.3	5	62.5	3	42.9	3	100	16	51.6
18	1	25	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.2
HPV18/others	-	-	-	-	1	12.5	-	-	-	-	1	3.2
Total	1	25	-	-	1	12.5	-	-	-	-	2	6.4
35	-	-	2	22.2	-	-	1	14.3	-	-	2	6.4
HPV35/others	-	-	-	-	1	12.5	-	-	-	-	2	6.4
Total	-	-	2	22.2	1	12.5	1	14.3	-	-	4	13
52	-	-	-	-	1	12.5	-	-	-	-	1	3.2
HPV52/others	-	-	-	-	-	-	1	14.3	-	-	1	3.2
Total	-	-	-	-	1	12.5	1	14.3	-	-	2	6.4
31	-	-	1	11.1	-	-	-	-	-	-	1	3.2
56	-	-	-	-	-	-	1	14.3	-	-	1	3.2
69	-	-	2	22.2	-	-	-	-	-	-	2	6.4
Other types	-	-	1	11.1	-	-	1	14.3	-	-	2	6.4
Low risk	1	25	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.2
Total	1	25	4	44.4	-	-	2	28.6	-	-	7	22.4
Total	4	100	9	100	8	100	7	100	3	100	31	100

Table 4: Association between HPV positivity and *C. trachomatis* (CT) seroprevalence according to histologic diagnosis.

	≥ CIN 2 versus CIN1 and negative for neoplasia			
	Odds ratio*	p-value	Odds ratio**	p-value
HPV+/CT+	8.00 (1.31 -62.62)	0.007	1.83 (0.72 - 4.69)	0.16
HPV 16 and HPV18 / CT+	13.00 (1.78 -121.37)	0.002	2.97 (0.91 - 9.99)	0.041
Other high risk HPV types / CT+	6.50 (0.78 - 66.96)	0.038	1.48 (0.38 - 5.80)	0.52

* Reference for Odds ratio was HPV-negative and CT-negative cases.

** Reference for Odds ratio was HPV-positive and CT-negative cases.

Includes single and multiple HPV infections.

5. CONCLUSÕES

5.1. A prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com exame citopatológico alterado foi de 86,3%.

5.2. A soropositividade para *C. trachomatis* em mulheres com exame citopatológico alterado foi de 26%.

5.3. A prevalência de *C. trachomatis* foi mais elevada em mulheres HPV positivas quando comparadas com mulheres HPV negativas, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa.

5.4. Os tipos de HPV mais prevalentes em mulheres soropositivas para *C. trachomatis* foram os tipos 16, 35, 18 e 52.

5.5. Diagnósticos neoplásicos foram mais comuns do que os não neoplásicos em mulheres com testes positivos para HPV e *C. trachomatis*. A infecção por HPV, principalmente pelos tipos 16 e 18, e a soropositividade para *C. trachomatis* foi significativamente associada com o diagnóstico neoplásico (diagnóstico de NIC 2 ou mais grave).

5.7. A infecção pelos tipos 16 e 18 e a soropositividade para *C. trachomatis* mostrou uma significância limítrofe com o diagnóstico neoplásico (NIC 2 ou pior diagnóstico) tomando como referência casos HPV positivos e *Chlamydia trachomatis* soronegativas.

REFERÊNCIAS

1. Alvarenga GC, Sá EMM, Passos MRL et al. Papilomavírus humano e carcinogênese no colo do útero. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 2000; 12(1): 28-38.
2. Alves RRF. Infecção do colo uterino por múltiplos tipos do Papilomavírus humano em adolescentes sexualmente ativas: prevalência, fatores associados e anormalidades citológicas. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical; 2006.
3. Anttila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001;285:47-51.
4. Araújo RSC, Guimarães EMB, Alves MFC, et al. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease* 2006; 25: 397- 400.
5. Bandea CI, Kubota K, Brown TM, et al. Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene. *Sexually Transmitted Infections* 2001; 77: 419(4).
6. Barros NKS, Alves RRF, Carneiro MAS, et al. O papel da associação das infecções por Papilomavirus humano e a *Chlamydia trachomatis* no desenvolvimento do câncer cervical. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2007; IV(2): 114-118.
7. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32S: S16-S24.

8. Birner P, Bachtary B, Dreier B, et al. Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. *Modern Pathology* 2001; 14(7): 702-709.
9. Black MC. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10(1): 160-84.
10. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K et al. *The Journal Infections Diseases* 2009; 199: 926-35.
11. Bosch FX. Epidemiology of human papillomavirus infections: New options for cervical cancer prevention. *Salud Pública de México* 2003; 45(3): S326-S339.
12. Bosch FX & Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Research* 2002; 89:183-190.
13. Brunham RC, Peeling RW. *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect Agents Diseases* 1994; 3: 218.
14. Brunham RC & Rey-Ladino J. Immunology of Chlamydia infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature Reviews* 2005; 5: 149-161.
15. Buck CB, Cheng N, Thompson CD et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *The Journal of Virology* 2008; 82: 5190-7.
16. Bulkman NW, Bleeker MC, Berkhof J, et al. Prevalence of types 16 and 33 is increased in high-risk human papillomavirus positive women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *International Journal of Cancer* 2005; 117 (2): 177-191.
17. Caliendo AM. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infection Using Amplification Methods: Can we Afford it? *Clinical Microbiology Newsletter* 1998; 20(9): 75-78.

18. Carvalho MOO, Carestiato FN, Perdigão PH, et al. Human Papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective study. *Brazilian Journal on Infectious Diseases* 2005; 9: 398-
19. Castle PE, Wacholder S, Lorinez AT, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus- infected women. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; 94(18): 1406-1414.
20. Cavalcanti SMB, Carestiato FN. Infecções causadas pelos Papilomavírus humano: Atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnósticos. *Jornal brasileiro de doenças transmissíveis* 2006; 18(1): 73-79.
21. CDC- A centers for Disease Control and Prevention- Prevention of Genital Human papillomavirus Infection. Gerberding JL (Director) Department of Health and Human Services. Report to Congress 2004.
22. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 910-919.
23. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2003; 88: 63-73.
24. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal Infectious Diseases* 2005; 191(11): 1808 -16.
25. Codes JS, Cohen DA, Melo NA, et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2002; 24(2): 101-6.

26. Coppleson M, Dalrymple JC, Atkinson KH. Diferenciação colposcópica das anormalidades com origem na zona de transformação. *Colposcopia. Clinical Obstetrics and Gynecology* 1993; 1:85-112.
27. Crosbie EJ, Kitchener HC. Cervarix™-a bivalent L1 virus-like particle vaccine for prevention of human papillomavirus type 16- and 18-associated cervical cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2007; 7(3):391–6.
28. Crum CP, Cibas ES, Lee KR. *Pathology of Early Cervical Neoplasia*. New York, Churchill Livingstone, 1997.
29. Curta JC, Simão RCG, Seger J. Vacina de DNA contra doenças infecciosas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2008; 40(3): 187-191.
30. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization* 2007; 85: 719–726.
31. Da Ros CT, & Schmitt CS. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Asian Journal of Andrology* 2008; 10(1): 110- 114.
32. Darville T. Chlamydia trachomatis infections in neonates and young children. *Seminars in Pediatric Infectious Disease* 2005; 16: 235-244.
33. Demay RM. The Pap smear. In: *The art and the science of cytopathology*. Chicago: ASCP Press: 1993; 61–185.
34. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
35. D’ottaviano-Morelli MGL, Zeferino L, Cecatti, JG, et al. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma based on cytological screening in

the region of Campinas, São Paulo, Brazil. *Cadernos Saúde Pública* 2004; 20(1): 153-159.

36. Do Carmo EFS, Fiorini A. Principais Técnicas Moleculares para Detecção do Papilomavírus Humano. *Revista de Saúde Pública* 2007; 2(1): 29-31

.37. Dores GB, Taromaru EK, Gallo C. Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV- induzidas e do câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. *NewsLab* 1999; 35: 196-205.

38. Dores GB, Torumaru EK, Bonomi CG, et al. Determinação da Infecção do Papilomavírus Humano por Captura Híbrida II: Correlação com achados morfológicos. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis* 2005; 17(4): 255-258.

39. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201-5207.

40. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, et al. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *The Journal of Virology* 2003; 77: 1410-26.

41 Florin L, Sapp C, Streeck RE, et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *The Journal of Virology* 2002; 76: 10009-14.

42. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk área for cervical câncer. *Journal Infections Diseases* 1999; 180(5): 1415-23.

43. Franco EL, Tsu V, Herrero R, et al. Integration of Human Papillomavirus Vaccination and Cervical Cancer Screening in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 2008; 26S: L88-L95.
44. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 46-54.
45. Garcia-Espinosa B, Nieto-Bona MP, Rueda S, et al. Genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. *Diagnostic Pathology* 2009; 4: 31.
46. Girdner J, Cullen AP, Salama TG, et al. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 199; 37(5); 1579-1581.
47. Giuliano AR, Papenfus MR, Denman CA, et al. Human papillomavirus prevalence at the USA-Mexico border among women 40 years of age and older. *International Journal of STD & AIDS* 2005; 16: 247-51.
48. Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, et al. *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol* 2005;96:181-6.
49. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, et al. Reproducibility of HPV 16 and 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods* 2003; 112: 23-33.
50. Grimwood J, Olinger L, Stephens RS. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infection and Immunity*.2001; 69:2383.

51. Grinstein E, Shan Y, Karawajew L, et al. Cell Cycle-controlled Interaction of Nucleolin with the Retinoblastoma Protein and Cancerous Cell Transformation. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(3): 22223-22235.
52. Gross GE, Barrasso R. Infecção pelo papillomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas 1999.P. 431.
53. Guimarães EMB, Guimarães MDC, Vieira MAS, et al. Lack of utility of risk score and gynecological examination for screening for sexually transmitted infections in sexually active adolescents. *BMC medicine* 2009; 7(8): 1-6.
54. Hall SG. *Chlamydia trachomatis*: Update on laboratory diagnosis. *Check Sample*. American Society for Clinical Pathology 1997; 49(4): 49-61.
55. Hanuka N, Glasner M, Sarvo I. Detection of IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in sera of patients with chlamydial infections: use of immunoblotting and immunoperoxidase assays. *Sexually Transmitted Diseases*. 1988; 15: 93.
56. Hatch TP, Allan I, Pearce JH. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J. Bacteriol* 1984;157:13.
57. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *Journal Infections Diseases* 2005; 191(11):1796-807.
58. Ho GY, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87: 1365-1371.
59. Hoory T, Monie A, GravittP, et al. Molecular Epidemiology of Human

- Papillomavirus. *Jornal da Associação Médica de Formosa* 2008; 107(3): 198-217.
60. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2003;127: 940-945.
61. Igietseme JU, Black CM, Caldwell HD. *Chlamydia* vaccines: strategies and status. *BioDrugs* 2002; 16: 19.
62. Igietseme JU, Eko FO, Black CM. Contemporary approaches to designing and evaluating vaccines against *Chlamydia*. *Expert Review of Vaccines* 2003; 2:129.
63. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 15/03/2009.
64. Jones RB, Batteiger BE.. Human immune response to *Chlamydia trachomatis* infections. In *Chlamydial Infections*. J. Oriel, G. Ridgway, J. Schachter, D. Taylor-Robinson, and M. Ward, eds. Cambridge University Press, London. 1986.P. 423.
65. Kawa D, Stephens R. Antigenic topology of chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity. *The Journal of Immunology* 2002; 168: 5184.
66. Kellogg JA, Seiple JW, Klindedinst JL, et al.. Improved PCR detection of *Chlamydia trachomatis* by using an altered method of specimen transport and high-quality endocervical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(10): 2765-84.
67. Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, et al. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *Journal of the National Cancer Institute* 1994; 86(7): 494-9.

68. Kjaer HO, Dimcevski G, Hoff G, et al. Recurrence of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection evaluated by mailed samples obtained at home: 24 weeks prospective follow-up study. *Sexually Transmitted Infections* 2000; 76: 169-72.
69. Kjaer SK, van de Brule AJ, Paull G, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high cervical squamous intraepithelial lesions in young women: Population based prospective follow up study. *British Medical Journal* 2002; 325: 572-576.
70. Koskela P, Antilla T, Björge T, et al. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk for invasive cervical carcinoma. *International Journal of Cancer* 2000; 85:35-39.
71. Kritski LA, Rossetti ML, Bonfim G. Reação em Cadeia da Polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. *Jornal de pneumologia* 1997; 23(1): 33-42.
72. Kurman .RJ, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. New york: Springer-Verlag; 1994
73. Kubo A, Stephens RS. Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target. *Molecular Microbiology* 2000; 38:772.
74. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 Tumor Suppressor Gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
75. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *International Journal of Cancer* 2001; 91(3): 412-20.
76. Longbottom D, Russell M, Dunbar SM, et al. Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-

kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep. *Infection and Immunity* 1998; 66:1317.

77. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma Venereum. *Sexually Transmitted Infections* 2002; 78: 90-92.

78. Mabey D, Solomon A. The effect of antibiotic treatment on active trachoma and ocular *Chlamydia trachomatis* infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2003; 1: 209-216.

79. Massad LS, Einstein M, Myers E, et al. The impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer prevention efforts. *Gynecologic Oncology* 2009; 114: 360–364.

80. Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, et al. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Different results after adjustment for HPV DNA and antibodies. *Br J Cancer* 2003;89:831-3.

81. Miranda AE, Szwarcwald CL, Peres RL, et al. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sexually Transmitted Diseases* 2004; 31(9): 542-6.

82. Mitchell FM, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, et al.. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesion: A meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology* 1998;91: 626-63.

83. Molijn A, Kleter B, Quint W, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32S: S43-S51.

84. Moscicki AB. HPV Vaccines: Today and in the Future. *Journal of Adolescent Health* 2008; 43: S26–S40.

85. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24(S3): S3/42–S3/51.

86. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 2003; 348(6): 518-27.
87. Muñoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, et al. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24(S3): S1-S10.
88. Murray PR, Baron E, Pfaller MA, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, D.C: ASM Press 1999. P.1773.
89. Murta EFC, Souza MAH, Júnior EA, et al. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *candida* sp and human papillomavirus in cytological smears. *Revista Paulista Medicina* 2000; 118(4): 105-8.
90. Mygind P, Christiansen G, Persson K, et al. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 1998; 5:313.
91. Navarro C, Jolly A, Nair R, et al. Risk factors for genital chlamydial infection. *The Journal Infectious Disease* 2002; 13(3): 195-207.
92. Newhall WJV. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*. 1987; 55:162.
93. Niessner A, Kaun C, Zorn G, et al. Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-B pathway. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 188:108.
94. Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, Ciotti M. 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. *Intervirology* 2007;51:230-4.

95. Pagliusi SR, Dillner J, Pawlita M, et al. Chapter 23: International Standard reagents for harmonization of HPV serology and DNA assays- an update. *Vaccine* 2006; 24(S3):193-200.

96. Peitsaro P, Johansson B, Syjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative Real-Time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 886-891.

97. Pitta DR, Sarian LO, Campos EA, et al. Phylogenetic classification of human papillomavirus genotypes in high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women from a densely populated Brazilian urban region. *São Paulo Medical Journal* 2009; 127(3): 122-127.

98. Platz-Christensen JJ, Sundstrom E & Larsson PG. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 1994; 73:586-8.

99. Pretorius RG, Belinson JL, Zhang WH, et al. The colposcopic impression – Is it influenced by the colposcopist's knowledge of the findings on the referral papanicolaou smear? *Journal of Reproductive Medicine* 2001; 46:724-728,

100. Quint K, Porras C, Safaeian M, et al. Evaluation of Novel PCR-Based Assay for Selection and Identification of *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45(12): 3986-3991.

101. Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Revista. Saúde Pública* 2008; 42(1): 123-30.

102. Rapose A. Human papillomavirus and genital cancer. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 2009; 75(3): 236-243.
103. Read TD, Brunham RC, Shen C, et al. Genome sequence of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Research* 2000; 28:1397.
104. Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, et al. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad Saude Publica* 2009;25:953-64.
105. Russomano F, Camargo MJ, Reis AFF, et al. Tratamento da infecção subclínica pelo papilomavirus humano (HPV) no colo uterino: consenso e controvérsias. *Jornal Brasileiro de DST* 1998; 6: 27-36.
106. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, et al. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol* 2005;162:668-75
107. Sanjose S, Almirall R, Lloveras B, et al. Cervical human papillomavirus infection in female population in Barcelona, Spain. *Sexually Transmitted Disease* 2003; 287: 2114-9.
108. Schachter J, Stamm WE. *Chlamydia trachomatis*. In: Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, D.C.: ASM Press 1999. P. 669-677.
109. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International Journal of Gynecological Cancer* 2005; 15(5): 727-746.
110. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human papillomavirus Infection and Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 31: 14-19.

111. Schlecht N, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer* 2003; 103: 519-524.
112. Schwarz TF. Human papillomavirus–16/18 candidate vaccine adjuvanted with AS04 and its impact on the incidence of cervical cancer. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2007; 2(3):293–303.
113. Scoot M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8: 209-220.
114. Seadi CF, Oravec R, von Poser B et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2002; 38(2): 125-133.
115. Sichero L, Boccardo E, Villa LL. Métodos de diagnóstico. Em: HPV na prática clínica. Disponível em: <http://www.hpvinfos.com.br/hpv-6.htm>. Acessado em 29/10/2009.
116. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185: 324-31.
117. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, et al. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *International Journal of Cancer* 2004; 111: 431- 439.
118. Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Journal of Pathology* 2006; 208: 152-164.

119. Solomon D & Nayar R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal. Revinter. 2^a ed., 2004; p.89-90.
120. Southern AS, Herrington CS. Molecular events in uterine cervical câncer. Sexually Transmitted Infections 1998; 74: 101-9.
121. Stamm WE, Jones RB, Batteiger BE. Chlamydial Diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice in Infectious Diseases. 6th ed. USA: New York: Elsevier Churchill Livignstone 2005; 2 (Pt3): 2236-2255.
122. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, et al. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. J Clin Virol 2005;32 Suppl 1:S25-33.
123. Stern PL. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. Journal of Clinical Virology 2005; 32S: S72- S81.
124. Stevens MP, Tabrizi SN, Quinn MA, et al. Human papillomavirus genotype prevalence in cervical biopsies from women diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in Melbourne, Austrália. International Journal of Gyneacological cancer 2006; 16: 1017-1024.
125. Stevens MP, Garland SM, Tan JH, et al. HPV Genotype Prevalence in Women with Abnormal Pap Smears in Melbourne, Australia. Journal of Medical Virology 2009; 81: 1283-1291.
126. Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE. A comparative review of laboratory developed tests utilizing Invader[®] HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. Journal of Clinical Virology 2009; 45(S1): S73-S77.

127. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, et al. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. *Acta Biochimica Polonica* 2008; 55(4): 687-692.
128. Tamim H, Finan RR, Sharida HE, et al. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:277–81.
129. Tham KM, Chow VT, Singh P, et al. Diagnostic sensitivity of polymerase chain reaction and southern blot hybridization for the detection of human papillomavirus DNA in biopsy specimens from cervical lesions. *American Journal of clinical pathology* 1991; 95(5): 638-646.
130. Thomas NS, Luscher M, Storey CC, et al. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology* 1997; 143 (Pt6): 1847-1854.
131. Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *British Journal of Cancer* 2006; 95(11):1459-66.
132. Vincelle J, Schirm J, Bourgault AM, et al. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(1): 74-80.
133. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, et al. Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia trachomatis* tests. *International Journal of STD & AIDS* 2002; 13(2): 23-35.
134. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, et al. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infection and Immunity* 1989; 57: 1040-1049.

135. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology* 2009; 19: 97–113.
136. Wagar, E. A., J. Schachter, P. Bavoil, and R. S. Stephens. 1990. Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. *Journal Infectious Disease* 162:922.
137. Wagels G, Rasmussen S, Timms P. Comparison of *Chlamydia pneumoniae* isolates by Western blot (immunoblot) analysis and DNA sequencing of the OMP2 gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 2820.
138. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal Pathology* 1999; 189(1): 12-9.
139. Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341:1633-1638.
140. Wang SS, Hildesheim H. Viral and Host Factors in Human Papillomavirus Persistence and Progression. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 31: 31-35.
141. Ward ME. Chlamydial vaccine: future trends. *Journal Infection* 1992;1:11
142. Watson MW, Lambden PR, Clarke IN. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29:1188.
143. Watson MW, Lambden JS, Everson, et al. Immunoreactivity P. R. of the 60-kDa cysteine-rich proteins of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, and

Chlamydia pneumoniae expressed in *Escherichia coli*. Microbiology 1994; 140: 2003.

144. Weinstock H, Dean D, Bolan G. *Chlamydia trachomatis* infections in Sexually Transmitted Diseases in the AIDS Era Part II. Infectious Diseases Clinics of North America 1994; 8(4): 797-819.

145. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, et al. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in the United States. Journal of the National Cancer Institute 2009; 101: 475-487.

146. Woodman CBJ Collins SI, Young L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews 2007; 7: 11-22,

147. Wright TC, Cox JT, Massad LS et al. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. Journal Of the American Medical Association 2002; 287:2120-2129.

148. Zeferino LC & Derchain SF. Cervical cancer in the developing world. Best Practice & Research clinical Obstetrics and Gynaecology 2006; 20 (3): 339-354.

149. Zahm DM, Nindl I, Greinke C, et al. Colposcopic appearance of cervical intraepithelial neoplasia is age dependent. American Journal of Obstetrics & Gynecology 1998; 179:1298-1304.

150. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, et al. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. Modern Pathology 2007; 20: 167-174.

151. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 2000; 92(9): 690-698.

ANEXOS

Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 2- Questionário Padronizado

Universidade Federal de Goiás

Santa Casa de Misericórdia de Goiânia

Consentimento Informado

PESQUISA: Prevalência e genotipagem das infecções por Papilomavirus humano e soropositividade para *Chlamydia trachomatis* em mulheres portadoras de neoplasias cervicais.

EU, sra _____
Idade, _____ RG _____, endereço _____
_____, Telefone _____ de
contato _____, registro hospitalar _____,

atendida na Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, no Ambulatório de Oncologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia fui convidada a participar desta pesquisa porque o resultado do meu exame de prevenção (Colpocitologia oncótica) mostrou anormalidades das células do colo uterino. Sei que responderei a um questionário sobre informações pessoais mantendo meu anonimato (serão avaliadas somente pelo médico que me atendeu) e que as fichas ficarão de posse do(s) Doutor(es) responsáveis pela pesquisa que são da Universidade Federal de Goiás e Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

Sei que serei submetida à uma investigação que é necessária para esclarecer as alterações encontradas no meu exame preventivo e receber o tratamento que for preciso. Esta investigação consta de novo preventivo, e da mesma forma, será colhida secreção para descobrir se existe um tipo de vírus chamado HPV relacionado ao meu problema. Esta secreção será utilizada para fazer exame chamado de reação em cadeia da polimerase (PCR) e também poderá ser utilizada posteriormente para outras pesquisas também relacionadas ao HPV. Será realizado também um exame colposcópico, no qual o médico vai olhar o colo do meu útero com lente de aumento, e caso seja encontrada alguma alteração, esta será biopsiada, ou seja, será retirado um pedaço muito pequeno para saber com certeza o que eu tenho. Esta biópsia é feita no ambulatório, é simples, não dói e o máximo que pode causar é um pequeno sangramento, que logo para. Caso seja descoberto que eu tenho uma alteração mais grave serei submetida a uma retirada de pedaço maior, feito com anestesia local para que eu não sinta dor. Este procedimento também é simples, normalmente feito no ambulatório, e às vezes pode causar um sangramento maior, porém caso isto ocorra, serei tratada com segurança, pois estarei no hospital com médicos capacitados para resolver o problema. Também conforme indicação do médico e de acordo com o resultado do meu exame histopatológico, poderei ser submetida a uma cirurgia se este for o caso.

Além disto, também serei submetida a uma coleta de sangue que será realizada por um profissional habilitado. Este material será destinado a um exame

para informar se tenho ou já tive outro tipo de infecção causada por uma bactéria chamada *Chlamydia trachomatis*. Em caso de resultados positivos serei tratada conforme a conduta clínica de rotina adotada pelos médicos responsáveis pelo meu atendimento.

Todos estes exames estão indicados para o esclarecimento, diagnóstico e tratamento de possíveis lesões de colo de útero que podem estar presentes em casos como o meu. Não serei submetida a exames desnecessários, tudo será feito como normalmente se faz, de acordo com os programas de prevenção do câncer do colo do uterino, e tratamento adequado. Após o diagnóstico e tratamento inicial dependendo da indicação médica, deverei retornar em intervalos de mais ou menos 6 meses para acompanhamento e controle de meu problema.

Autorizo os pesquisadores da Universidade Federal de Goiás e Santa Casa de Misericórdia de Goiânia a realizarem uma cópia dos resultados dos exames de laboratório para que sejam anexados às fichas de pesquisa. Autorizo também o arquivo de material biológico para ser utilizado em pesquisas futuras.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e de ser atendida no ambulatório sempre que necessário. **A não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório.**

Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de telefonar para as Doutoradas Silvia Rabelo (32096044), Megmar Carneiro (32096129) ou Rosane Alves. Sei que não serei paga para participar deste estudo.

Goiânia ____ de _____ de 200 ____

Rúbrica da paciente

Médico responsável pelo atendimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA

***Estudo epidemiológico e Molecular da Infecção pelo Papilomavírus Humano
(HPV) em Mulheres Portadoras de Lesões Cervicais em uma Alta
Prevalência de Câncer do Colo Uterino - Região Centro-Oeste***

Ficha pré-codificada para conduta diagnóstica e terapêutica

Ficha | _ | _ | _ | _ |

Registro | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

Data da primeira consulta | _ | _ | / | _ | _ | / | _ | _ |

Nome completo

Idade _____

Data da última menstruação _____

Endereço: Rua _____ número _____

Bairro _____ Cidade _____

Telefone: (____) _____

Telefone para contato: (____) _____ Falar com: _____

Observação: _____

Informações epidemiológicas

Início da atividade sexual:

Número de parceiros:

Último Exame Realizado:

Número de gestações : _____ Abortos: _____

Número | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

Obs:

Resultado

Código: _____

2.Colposcopia

Data _ | _ | / | _ | _ | / | _ | _ |

Código: _____

| 1 | Ausência de imagem | 2 | Epitélio aceto-branco | 3 | Mosaico
suspeita

| 4 | Vasos atípicos | 5 | Pontilhado | 6 | Leucoplasia | 7 | Schiller positivo

| 8 | Insuficiente | 9 | não realizado | Outros _____

3.Anátomo-patológico:**CÓDIGO DO EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO**

I1| Cervicite I2| Metaplasia escamosa madura I3| Metaplasia escamosa imatura
 I4| alteração glandular reacional I5| atipia glandular neoplásica sem outras
 especificações I6| adenocarcinoma "in situ" I7| Adenocarcinoma invasivo I71
 Carcinoma adenoescamoso invasivo I8| HPV/Condiloma I9| NIC I I10| NIC II I11|
 NIC III I12| Carcinoma escamoso microinvasivo I13| Carcinoma escamoso invasivo
 I14| Adenocarcinoma endometrial invasivo I15| NIC III + AIS I16| Outros _____

3.1.Biópsia de colo Inãol Isiml Data _ | _ | / | _ | _ | / | _ | _ |

Resultado: Código: _____

3.2 CAF Inãol Isiml Data _ | _ | / | _ | _ | / | _ | _ |Resultado:
Código: _____**MARGENS** | | livres | | comprometidas

Código: _____

3.3.Conização a frio Inãol Isiml Data _ | _ | / | _ | _ | / | _ | _ |

Nº Biópsia | _ | _ | _ | _ | _ | _ | Código: _____

MARGENS | | livres | | comprometidas

Código: _____

