



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

ANA CLAUDIA CAMARGO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NA SECREÇÃO ENDOCERVICO-
VAGINAL DE PACIENTES COM VAGINOSE BACTERIANA E
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLEOMENES REIS - IPTSP/UFG
**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. EDDIE FERNANDO CANDIDO MURTA-
IPON/DGO/UFTM**

Tese de Doutorado

Goiânia-GO, 2010



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ **Dissertação**
☒ **Tese**

2. Identificação da Tese

Autor(a):	Ana Claudia Camargo Campos				
CPF:	892.024.651-34	E-mail:	anaucg@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo Empregatício do autor	Professor Universitário				
Agência de fomento:	Não se aplica				Sigla:
País:	Brasil	UF:	Goiás	CNPJ:	
Título:	Avaliação de citocinas na secreção endocervical-vaginal de pacientes com vaginose bacteriana.				
Palavras-chave:	citocina, papilomavírus humano, vaginose bacteriana				
Título em outra língua:	Evaluation of cytokines in endocervical-vaginal secretion of patients with bacterial vaginosis.				
Palavras-chave em outra língua:	cytokines, Human papillomavirus, bacterial vaginosis				
Área de concentração:	Microbiologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	09/04/2010.				
Programa de Pós-Graduação:	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IPTSP/UFG				
Orientador(a):	Cleomenes Reis				
CPF:	004.462.541-34	E-mail:	cleomenes_reis@hotmail.com		
Co-orientador(a):	Eddie Fernando Candido Murta				
CPF:	476.680.326-49	E-mail:	eddiemurta@mednet.com.br		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 10 / 05 / 2010

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

ANA CLAUDIA CAMARGO CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NA SECREÇÃO ENDOCERVICO-
VAGINAL DE PACIENTES COM VAGINOSE BACTERIANA E
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLEOMENES REIS - IPTSP/UFG
**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. EDDIE FERNANDO CANDIDO MURTA-
IPON/DGO/UFTM**

Projeto submetido ao CPGMTSP/
IPTSP/ UFG como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor na área de concentração de
Microbiologia.

Goiânia-GO, 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Campos, Ana Claudia Camargo.

C198a Avaliação de citocinas na secreção endocervico-vaginal de pacientes com vaginose bacteriana e papilomavírus humano [manuscrito] / Ana Claudia Camargo Campos. - 2010.

82 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cleomenes Reis. Co-Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.

Bibliografia.

1. Citocina. 2. Papilomavírus Humano. 3. Vaginose Bacteriana. I.Título

CDU: 618.15:578.827

"A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar;
fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar"
(Henry Peter)

DEDICATÓRIA

Dedico toda a minha vida, meu trabalho, minha consciência, ética, respeito, sabedoria e amor aos meus pais que foram e continuam sendo a fonte de toda a minha força interior e que são totalmente responsáveis por qualquer vitória que eu venha a alcançar. Obrigada por tudo que fizeram, contribuíram e se dedicaram, vocês são dignos do meu amor eterno.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

À banca de qualificação composta pelos Prof^{os}. Drs. André Kipnis, Ruffo de Freitas Junior, Ruy de Souza Lino Junior, José Daniel Gonçalves Vieira, Joaquim Caetano de Almeida Netto e Márcia Antoniazi Michelin que com certeza contribuíram substancialmente, a fim de melhorar o conteúdo dessa tese de doutorado.

Aos Prof^{os}. Drs. Álvaro Bisol Serafini, José Daniel Gonçalves Vieira e Fabrícia Paula de Faria por constituírem parte da Banca de Seleção no Concurso para Doutorado, 2007; possibilitando minha aprovação como doutoranda nessa instituição.

Aos membros da equipe interprofissional do Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Araújo Jorge onde iniciamos a nossa coleta de amostras: Drs. Ruffo de Freitas Junior, Luiz Fernando Jubé Ribeiro e Rossana de Araújo Catão e à técnica de enfermagem Sueze Moraes Viana pela amizade, presteza e colaboração na idealização do projeto.

Ao responsável pelo laboratório Médico Papanicolaou Joaquim I. Pimenta da Silva por realizar a leitura das lâminas de colpocitologia contribuindo com seus conhecimentos e experiência nas análises citológicas das amostras coletadas e à técnica Sebastiana pelo auxílio na coleta das amostras.

À Biomédica responsável pelo Laboratório de Microbiologia do IPTSP-UFG Lêda Maria Almeida Valadão, pelo profissionalismo e auxílio na realização da parte prática da presente obra.

Aos Servidores da PPGMT-IPTSP/UFG José Clementino de Oliveira Neto e Kariny Vieira Soares que com toda a sua dedicação cuidou com carinho de cada passo durante o curso de pós-graduação, auxiliando-nos com informações importantes, pessoalmente ou por e-mails.

À Biomédica responsável pelo Laboratório de Micologia do IPTSP-UFG Hildene Menezes e Silva pela realização das culturas de fungos e pelos conhecimentos e disponibilidade oferecidos.

À chefe da Divisão de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente - SMS de Goiânia Inácia Araújo Silva e à médica do mesmo serviço Dra. Ana Cristina de Castro por ser a introdutora do projeto na SMS-GO.

Ao Prof^o Dr. Régis Resende Paulinelli pelo auxílio na análise estatística do projeto de pesquisa e a disponibilidade em sempre me atender.

Ao Prof^o. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, meu co-orientador e à Prof^a Dr^a Márcia Antoniazi Michelin pela confiança e orientação, pelos conhecimentos e experiências repassados e acreditarem neste projeto de pesquisa, possibilitando a realização prática

no Laboratório de Pesquisa em Oncologia - IPON da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.

Aos alunos de pós-graduação da UFTM Ariana de Melo Borges, Bruna França Matias, Cláudia Rodrigues Mendonça, Douglas Reis Abdalla e Nelson Ranieri Tirone pela amizade e por me apoiarem no Laboratório IPON auxiliando imensamente a realização da pesquisa.

Às coordenadoras de Enfermagem Sue Christine Siqueira e Edicassia Cardoso de Rezende e ao gerente acadêmico Adriano Luis Fonseca por permitirem me ausentar por um período da Faculdade Estácio de Sá de Goiás para que eu pudesse realizar a pesquisa no Laboratório IPON da UFTM e em especial à Prof^a Dr^a. Denise Gonçalves Pereira pela amizade incondicional.

Por fim, ao Prof. Dr. Cleomenes Reis que continua sendo o grande responsável por mais esta obra, “tudo combinado e nada resolvido” famosa frase tantas vezes repetidas. Agradeço pela constante paciência, amizade, experiência, conhecimento, sabedoria e incentivo nos momentos de desânimo e de tentativas de abandono, viabilizando um sonho hoje concretizado, mesmo com tantos obstáculos mais uma vez ultrapassados.

SUMÁRIO

Lista de tabelas e gráfico.....	ix
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas.....	x
1. RESUMO.....	xiii
2. ABSTRACT.....	xv
3. INTRODUÇÃO.....	17
3.1 - Considerações gerais sobre as infecções genitais.....	17
3.2 - Etiologia das vaginoses bacterianas.....	18
3.3 - Componentes microbianos do biofilme.....	18
3.4 - Classificação dos elementos de defesa imune.....	20
3.4.1 - Imunidade Inata.....	20
3.4.2 - O papel das citocinas na resposta imunológica.....	20
3.4.3 - Perfil de citocinas durante as fases do ciclo menstrual.....	21
3.4.4 - Imunidade Adaptativa.....	22
3.4.4.1 - Resposta imune Th1 e Th2.....	22
3.4.5 - Defesa imunológica no trato genital feminino.....	23
3.4.6 - Ação das citocinas nas infecções bacterianas e virais.....	24
3.5 - Eventos que poderiam alterar as respostas do sistema imunológico.....	25
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 - Objetivo geral.....	27
4.2 - Objetivos específicos.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Área e população de estudo.....	28

5.2 Coleta e Transporte das amostras:	29
5.3 - Diagnóstico das vaginoses bacterianas:	30
5.3.1 - Isolamento e identificação das bactérias:	31
5.4 - Dosagem de citocinas:	31
5.4.1 - Quantificação de citocinas:	31
5.5 - Tipagem do HPV:	33
5.5.1 - Extração do DNA:	33
5.5.2 - PCR para HPV:	34
5.5.3 - Ciclo de Amplificação de DNA:	35
5.5.4 - Detecção dos Produtos Amplificados:	35
5.6 - Análise Estatística:	36
6 - RESULTADOS:	37
7 - DISCUSSÃO:	43
8 - CONCLUSÕES:	48
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	49
ARTIGO CIENTÍFICO: Evaluation of cytokines in vaginal secretions of women with bacterial vaginosis associated with human papillomavirus:	57
ANEXO I: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO: American Journal of Reproductive Immunology:	73
ANEXO II: Documento de submissão à American Journal of Reproductive Immunology:	75
ANEXO III: Questionário:	76
ANEXO IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:	79
ANEXO V: Protocolo de Coleta do Material:	81
ANEXO VI: Protocolo CEPACCG nº 069/06:	82

TABELAS E GRÁFICO

➤ Tabela 1 - Fatores comportamentais e fisiológicos das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO, de acordo com a análise univariada.....	38
➤ Tabela 2 - Fatores comportamentais e fisiológicos das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO, de acordo com a análise multivariada.....	39
➤ Tabela 3 - Concentração de citocinas em mulheres com vaginose bacteriana.	41
➤ Tabela 4 - Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano.....	41
➤ Tabela 5 - Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano de alto risco.....	42
➤ Tabela 6 - Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano de baixo risco.....	42
➤ Gráfico 1 - Análise da frequência de HPV de alto risco (16,18,31,33,35) e baixo risco (6,11) durante o ciclo menstrual das mulheres analisadas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO.....	40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

➤ α	Alfa
➤ Abs	Absorvância
➤ Ac	Anticorpo
➤ ACV	Ausculata cardiovascular
➤ ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
➤ ACO	Anticoncepcional oral
➤ AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
➤ AR	Ausculata respiratória
➤ BHI PRAS	Brain Heart Infusion – PRAS (pré-reduzido e esterilizado em anaerobiose).
➤ Ca	Câncer
➤ CAIS	Centro de atenção integrada à saúde
➤ CPEMHA	Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal
➤ CO₂	Gás carbônico
➤ CNA	Colistina – ácido nalidíxico
➤ DGO	Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia
➤ DNA	Ácido desoxirribonucleico
➤ DNP	Substrato dinitrofenil fosfato
➤ dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
➤ DR	Dia relativo
➤ DST	Doenças sexualmente transmissíveis
➤ DUM	Data da última menstruação
➤ et al	e colaboradores
➤ E2	Oncoproteína
➤ E6,E7	Genes do HPV
➤ ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
➤ EUA	Estados Unidos da América
➤ °C	Graus Celsius
➤ g	Força gravitacional
➤ G, P, A	Gestação, paridade e aborto

➤ GO	Goiás
➤ h	hora e horas
➤ H ₂ O	Água
➤ H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
➤ HD	Hipótese diagnóstica
➤ HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
➤ HPV	Papilomavírus humano
➤ IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
➤ IC	Intervalo de confiança
➤ ICAM	Moléculas de adesão intercelular
➤ IFN- γ	Interferon - gama
➤ IgA	Imunoglobulina A
➤ IgG	Imunoglobulina G
➤ IL	Interleucina
➤ IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
➤ IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
➤ JEC	Junção escamo-colunar
➤ KOH	Hidróxido de potássio
➤ M	Molar
➤ Milli-Q	Água deionizada purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation®)
➤ MgCl ₂	Cloreto de magnésio
➤ MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
➤ mM	Mili molar
➤ ml	Mililitros
➤ n ou N	Número de pacientes
➤ NaOH	Hidróxido de sódio
➤ NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
➤ NK	Célula <i>Natural Killer</i>
➤ nm	Nanômetros
➤ NO	Óxido nítrico
➤ OR	Odds ratio
➤ PA	Pressão arterial
➤ pb	Pares de base

➤ PBS	Salina tamponada com fosfato
➤ PBS T	Salina tamponada com fosfato acrescido de tween 20
➤ PCR	Reação em cadeia da polimerase
➤ pg	Picogramas
➤ pH	Potencial de hidrogênio
➤ PPGMTSP	Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
➤ PSF	Programa de saúde da família
➤ %	Porcentagem
➤ q.s.p	Quantidade suficiente para
➤ ®	Marca registrada
➤ sp	Espécies
➤ T CD4+	Células T com <i>cluster of differentiation</i> 4
➤ T CD8+	Células T com <i>cluster of differentiation</i> 8
➤ TAF	Tríplice açúcar ferro
➤ Taq	Enzima Taq DNA polimerase
➤ TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
➤ TLR4	Toll-like receptor 4
➤ TMB	Tetramethyl benzidine
➤ TNF-α	Fator de necrose tumoral - alfa
➤ Th0	Linfócitos T auxiliares do tipo 0
➤ Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
➤ Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
➤ Tr	Linfócitos T reguladores
➤ UFG	Universidade Federal de Goiás
➤ UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
➤ μl	Microlitro
➤ VB	Vaginose bacteriana
➤ VM	Vermelho de metila
➤ WHO	World Health Organization
➤ x²	Teste do qui-quadrado

1 - RESUMO

A vagina e a cérvix são as primeiras linhas de defesa física e imunológica contra patógenos sexualmente transmissíveis. No entanto, os processos infecciosos na vagina causados por micro-organismos potencialmente patogênicos como nas vaginoses bacterianas (VB) são muito comuns. Podendo estar associados a uma entidade mórbida como o papilomavírus humano (HPV). Avaliou-se a relação existente entre a presença de VB e o HPV no trato genital inferior, identificando os aspectos clínicos e laboratoriais das mulheres atendidas em um hospital e em 5 unidades básicas de saúde da cidade de Goiânia-GO e verificou-se a concentração de citocinas na secreção endocervical nos casos com VB e HPV. O estudo incluiu 173 mulheres sexualmente ativas entre 16 e 48 anos de idade, divididas em grupos: controle, com VB e com HPV de alto e baixo riscos. Aplicou-se um questionário onde foram analisados os fatores de riscos extrínsecos e intrínsecos destas pacientes. Realizou-se exames de cultura e identificação microbiana, verificando o pH vaginal, seguido da identificação do HPV de alto e baixo riscos pelo PCR e dosagem de citocinas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com cálculos do *odds ratio*, intervalo de confiança e *p* de 0,05. Foram identificados 47 casos de VB. A presença de pH vaginal $> 4,5$ mostrou resultado estatisticamente significativo ao aparecimento de HPV, $p=0,001$. Ao se analisar a regressão logística multivariada, os fatores de risco independentes para a presença de VB foram: ter mais de um parceiro sexual nos últimos 5 anos $p<0,001$ e ter mais de 3 relações sexuais por semana $p=0,002$. Já na presença de HPV os fatores independentes foram: estado civil casado $p=0,029$ e $pH \leq 4,5$ $p<0,001$ e no caso de ser HPV de alto risco o único fator considerado independente foi o $pH \leq 4,5$ $p=0,006$. Ao se relacionar as infecções pelo HPV de alto e baixo risco e pela presença de VB com alguns fatores imunológicos, através da dosagem das citocinas locais, verificou-se que as IL-2 e IL-12 mostraram maior concentração nos casos de VB e HPV se comparadas ao controle. A IL-6 mostrou-se elevada somente para HPV, seguidos pelo IFN-gama e a IL-10 embora estas duas últimas próximas ao estatisticamente significativo. Concluiu-se que na análise univariada que ter mais de um parceiro sexual nos últimos 5 anos e realizar mais de 3 relações sexuais por semana são fatores independentes associados à VB e a alcalinização da vagina provavelmente seja um fator predisponente às infecções

pelo HPV e a resposta imune, através das citocinas tipo Th1 da secreção vaginal na presença de VB e/ou HPV, possivelmente seja semelhante.

Palavras-chave: citocina, papilomavírus humano, vaginose bacteriana.

2 - ABSTRACT

The vagina and the cervix are the first immune and physical line of defense against sexually transmitted pathogens. However infectious process in the vagina, caused by potentially pathogenic microorganism such as bacterial vaginosis (BV), are very often. This may be associated with a morbid entity as Human Papillomavirus (HPV). It was evaluated the association between the presence of BV and HPV in the lower female genital tract, identifying the clinical and lab aspects in women who received medical attention at emergency rooms in the city of Goiânia-GO and observed the production of cytokines in endocervical secretions in cases with VB associated with HPV. This study included 173 sexually active women, between 16 and 48 years old, divided into groups: control, with BV and with high and low risk of HPV. A survey was conducted to collect the intrinsic and extrinsic factors associated with the patients. Microbial cultures, vaginal pH, identification of high and low risk of HPV by PCR, and the concentration of cytokines were performed. The result of the research data was submitted to a statistical analysis, calculating the *odds ratio*, confidence intervals and *p* of 0,05. Forty seven cases of BV were diagnosed. Besides, the presence of a vaginal pH > 4.5, showed a result statistically significant for the presence of HPV, $p = 0.001$ was also observed. When analyzing the multivariate logistic regression, the independent risk factors for the presence of VB were: having more than one sexual partner in the last 5 years $p < 0,001$ and have more than 3 sexual intercourses per week $p = 0,002$. But in HPV infection the independent risk factors were: being married $p = 0,029$ and $pH \leq 4.5$ $p < 0,001$ and in the case of high-risk HPV the only independent factor considered was the $pH \leq 4.5$ $p = 0,006$. Relating HPV infections with high and low risk and the presence of VB with some immune factors by the strength of local cytokines, it was found that, IL-2 and IL-12 were significantly elevated in cases of BV and HPV. The IL-6 was high only for HPV, followed by IFN-gamma and IL-10 although the last two showed a trend towards statistical significance in HPV cases. It was concluded through the univariate analysis that the factors, having more than one sexual partner in the last 5 years, a failure in the use of condoms and the presence of leucorrhoea and dyspareunia were related to the presence of BV and level of alkaline in the vagina which could possibly predispose to

infections HPV, and the immune response Th1-type cytokines in vaginal secretions in the presence of BV and/or HPV may also be similar.

Key-words: cytokines, Human papillomavirus, bacterial vaginosis.

3 - INTRODUÇÃO

3.1 - Considerações gerais sobre as infecções genitais:

Os estudos epidemiológicos, clínicos e microbiológicos das infecções genitais, sintomáticas ou não, tornaram-se importantes, principalmente devido a elevada incidência e frequente recidiva (Murta et al. 2000). Foi questionado por Nugent et al. (1991) e Murta et al. (2000) se entre as causas destas infecções, estariam relacionadas à falta de tratamento, à resistência ao tratamento, devido à seleção de inúmeras cepas de bactérias resistentes após o tratamento para vaginose bacteriana, ou à constante exposição aos fatores de risco (Austin et al. 2005).

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) estão entre as cinco primeiras categorias de enfermidades para as quais os adultos, em países em desenvolvimento, buscam ajuda médica, sendo a principal causa de morbidade no mundo (WHO 2001; Oliveira et al. 2007). Geralmente, elas causam desconforto e perda de produtividade no trabalho. As sequelas mais sérias e de maior duração surgem nas mulheres como doença inflamatória pélvica, câncer cervical, infertilidade, aborto espontâneo e gravidez ectópica, sendo que algumas podem levar ao óbito (WHO 2001; Barcelos et al. 2008; Anton et al. 2008). A presença de DST aumenta de três a cinco vezes os riscos de se adquirir e transmitir a infecção por HIV, e a vaginose bacteriana pode ser um co-fator de transmissão do HIV, principalmente entre as mulheres jovens (Barcelos et al. 2008; Mitchell et al. 2008).

A vagina e a cérvix são as primeiras linhas de defesa física e imunológica contra patógenos sexualmente transmissíveis (Gage et al. 2000; Lima et al. 2008; Weissenbacher et al. 2010). No entanto, os processos infecciosos na vagina causados por micro-organismos potencialmente patogênicos são muito comuns, sendo resultado de um crescimento profuso de vários agentes (Gage et al. 2000; Edwards 2004). As infecções genitais são geralmente causadas por protozoários, leveduras, bactérias e vírus que podem ocasionar aumento da secreção vaginal, irritação, prurido vulvar e, geralmente, odor fétido (Edwards 2004). Uma avaliação microscópica da secreção vaginal pode auxiliar no diagnóstico, porém, o ideal é a confirmação pela cultura microbiológica, pois processos inflamatórios não infecciosos podem apresentar sintomatologia semelhante (Edwards 2004; Lima et al. 2008).

3.2 - Etiologia das vaginoses bacterianas:

De etiologia não definida, a vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome inflamatória e recorrente do trato genital inferior feminina (Sturm-Ramirez et al. 2000; Cauci et al. 2002; Camargo-Campos et al. 2008a; Mitchell et al. 2008). A VB é caracterizada pela alteração da microbiota vaginal em que os lactobacilos, normalmente predominantes, são substituídos por micro-organismos diversos, com aumento das espécies de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp, *Bacteroides* sp, *Prevotella* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Mycoplasma hominis* ou *Ureaplasma urealyticum* e acompanhada pelo aumento do pH vaginal, levando à alcalinidade (Greca et al. 2004; Weissenbacher et al. 2010). Estas bactérias são capazes de produzir proteases que degradariam o muco secretado na cérvix, rompendo dessa maneira a barreira química protetora dos epitélios vaginal e cervical (Greca et al. 2004; Discacciati et al. 2004). A VB parece estar associada a várias doenças sexualmente transmissíveis, doença inflamatória pélvica e trabalho de parto prematuro (Greca et al. 2004; Barcelos et al. 2008; Weissenbacher et al. 2010), sendo caracterizada clinicamente por secreção vaginal fétida. É considerada, a infecção vaginal de alta prevalência em mulheres em idade reprodutiva (Camargo-Campos et al. 2008).

Vaginoses bacterianas, candidíases e tricomoníases são responsáveis por 90% dos casos de infecções genitais (Adad et al. 2001). O uso de antibióticos, gravidez, diabetes e as várias formas de imunodeficiência podem estar envolvidos no desencadeamento de repetidos episódios de infecção pela alteração da microbiota vaginal (Carvalho et al. 2003).

3.3 - Componentes microbianos do biofilme:

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus sexualmente transmissível do tipo DNA e é o principal co-fator no desenvolvimento de tumores cervicais, além de causar a verruga vulvar e o condiloma acuminado. (Machado et al. 2004; Watts et al. 2005). As alterações celulares citológicas compatíveis com lesão pelo HPV segundo Yamamoto et al. 2004 são: bi ou multinucleação, cariorrexe, clarificação do citoplasma, células fusiformes, células gigantes multinucleadas, células basais condilomatosas, coilocitose, coilocitose leve, condensação de filamentos, disceratose, halo perinuclear e núcleo hiper hiper Cromático. Os micro-organismos que colonizam a vagina estão de algum modo associados ao desenvolvimento de Neoplasia Intra-Epitelial Cervical (NIC), podendo

ser um co-fator para a infecção pelo HPV (Platz-Christensen et al. 1993; Murta et al. 2000). Todavia, outros pesquisadores (McNicol et al. 1999), consideraram pouco provável que esses agentes pudessem alterar a história natural do HPV influenciando a expressão dos oncogenes virais associados ao desenvolvimento de NIC. Porém, o fato é que, em mulheres com VB ou com achados de “clue cells” há uma maior frequência de HPV (Georgijevic et al. 2000; Silva et al. 2001; Greca et al. 2004).

Sabe-se que a infecção pelo HPV pode causar alterações nas células cervicais, sendo a principal causa de câncer neste local. Esta infecção é localizada na cérvix e a imunidade da mucosa é determinante para a patogênese viral (Discacciati et al. 2004). Muitas respostas imunes ao HPV parecem ser um fator importante para a persistência da infecção e evolução para lesões cervicais de alto grau, por ser o vírus um precursor do câncer nesta região (Castle et al. 2002; Discacciati et al. 2004).

Discacciati et al. (2004), relataram que após 4 meses da conização diatérmica do colo uterino como tratamento para NIC, houve uma diminuição na detecção de DNA de HPV e de anormalidades citológicas, tanto em mulheres com microbiota vaginal normal quanto as que apresentavam VB. Embora nestas últimas a frequência de DNA do vírus tenha sido maior se comparado às sem VB. Porém, não houve diferença significativa entre estas mulheres antes da conização diatérmica quanto à presença de DNA de HPV de alto risco (Crapolicchio et al. 2006). A frequência de anormalidades citológicas após conização foi maior nas pacientes com VB presentes antes da conização em comparação com as sem VB, contudo não está totalmente esclarecido se as bactérias anaeróbias envolvidas na VB e seus produtos metabólicos poderiam ter efeito direto na evolução das neoplasias de colo uterino (Discacciati et al. 2004). Sabe-se que o aumento do pH e a diminuição dos lactobacilos produtores de H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio), característicos da vaginose bacteriana, estão associados a um provável favorecimento da infecção por HIV e/ou HPV uma vez que H_2O_2 está relacionado com a proteção inata a esses vírus (Sturm-Ramirez et al. 2000).

A resposta imune contra o HPV de uma forma geral é mediada pela resposta imune celular, mas na imunidade específica é mediada por anticorpos da classe IgG e IgA contra frações antigênicas encontradas no muco cervical de pacientes com neoplasia cervical (Machado et al. 2004). O infiltrado inflamatório composto de macrófagos e células T CD4+ é observado em condilomas que regredem espontaneamente, e a resposta linfoproliferativa de células T CD4+ específica para o antígeno E2 (superficial) demonstrou-se associada à eliminação do HPV. Por outro

lado, células T CD8+ específicas para os antígenos E6 e E7 (replicação) são encontradas em pacientes com grandes lesões ou com tumor cervical. Além disso, a diminuição da resposta com baixa produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α é observada em pacientes com lesão intraepitelial de alto grau (Lee et al. 2004).

3.4 - Classificação dos elementos de defesa imune:

3.4.1 - Imunidade Inata

A imunidade inata é composta por células fagocitárias, ativação do sistema complemento, barreiras químicas como pela produção de quimiocinas e citocinas, físicas e microbiológicas (Murphy et al. 2010). A imunidade inata na superfície das mucosas exerce a primeira linha de defesa contra os micro-organismos patogênicos aos quais o hospedeiro é normalmente exposto (Lima & Alves 2008). As células epiteliais e outras como as dendríticas, as células NK (natural killer), os neutrófilos e macrófagos, que também estão presentes no trato genital, secretam constitutivamente e, em resposta ao estímulo antigênico, aumentam a secreção de peptídeos antimicrobianos, quimiocinas e citocinas (Wira et al. 2005).

3.4.2 - O papel das citocinas na resposta imunológica

As fases efectoras da imunidade inata e específica são, em grande parte, mediadas por hormônios protéicos designados citocinas. Na imunidade inata, as citocinas efectoras são na sua maior parte, produzidas por fagócitos mononucleares e na imunidade específica pelos linfócitos T ativados e são capazes de provocar reações inflamatórias ricas em neutrófilos que servem para conter e, quando possível, erradicar as infecções microbianas (Machado et al. 2004). Como muitas dessas citocinas são produzidas por certas populações de leucócitos provenientes diretamente do sangue como: monócitos, neutrófilos ou eosinófilos, são conhecidas como interleucinas (Machado et al. 2004).

Assim, as citocinas são um grupo de proteínas intercelulares produzidas por várias células do sistema imunológico que estão envolvidos na geração e manutenção de uma resposta imune. Elas são induzidas por estímulos específicos e são responsáveis pela diferenciação dos vários tipos de células, levando a uma complexa rede de

atividades imunológicas atraindo células para o sítio da lesão, onde farão o processo de defesa do hospedeiro (Machado et al. 2004).

Entre as várias citocinas que participam da defesa contra bactérias, tem sido dado destaque às citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6. Essas citocinas são produzidas nas fases iniciais da infecção e são responsáveis, por meio de sua ação no hipotálamo, pelo aparecimento da febre que inibe a multiplicação bacteriana. Elas aumentam a expressão das moléculas de adesão (selectina P e pelas moléculas de adesão intercelular - ICAM), facilitando a passagem de células do vaso para o sítio da infecção, e também estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO) e a destruírem bactérias. Outra citocina produzida na fase inicial da infecção que interfere na resposta imune adaptativa, é a IL-12 produzida por macrófagos e tem papel importante na diferenciação de células Th0 para Th1 (Machado et al. 2004).

A relativa proporção de citocinas indutoras de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) determina a magnitude e as consequências de uma resposta inflamatória (Witkin et al. 2000; Tavares-Murta et al. 2008). Muitos fatores influenciam na predominância de IL-12 ou IL-4 e consequentemente sobre a indução de uma resposta imune Th1 ou Th2 que será induzida no trato genital feminino, em um dado período, em resposta a um agente infeccioso específico. O sêmen humano é um potente indutor de IL-10 e um inibidor de transcrição dos genes para Interferon- γ (IFN- γ) e IL-12, portanto, relações sexuais possivelmente induziriam uma resposta imune Th2 e poderiam inibir a resposta Th1 em mulheres (Jeremias et al. 1998; Tavares-Murta et al. 2008).

3.4.3 - Perfil de citocinas durante as fases do ciclo menstrual:

Os níveis de interleucinas (IL) 2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 apresentam menor concentração no primeiro dia da ovulação. Na fase lútea, as concentrações de estradiol correlacionam-se positivamente somente com IL-10 (Shrier et al. 2003), enquanto que na fase folicular encontram-se inversamente relacionados com a imunoglobulina IgA e IL-10; isto sugere que o estrógeno tem potencial influência na imunidade local do trato genital (Kutteh et al. 1998). As concentrações de IL-2 também se apresentam inversamente correlacionados, na fase folicular, com o estradiol, indicando que, em adolescentes, o estradiol pode afetar a regulação das células T no trato genital. Desta

forma, a influência do estradiol sobre a concentração de citocinas em secreções cervicais pode ser um mecanismo de regulação específico (Shrier et al. 2003).

Além disso, aumentos significativos de concentração de IL-10 foram observados na fase não ovulatória do ciclo menstrual (Gravitt et al. 2003). Há algumas evidências que sugerem que os hormônios possuem um papel de regulação na concentração dessas citocinas locais, independentemente do volume de secreções. Um estudo anterior demonstrou que os níveis de IL-10 e IL-12 foram mais baixos entre os dias 10-17 (próximo à ovulação) e em mulheres na pós-menopausa (Crowley-Nowick et al. 2000).

3.4.4 - Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa, principalmente mediante a presença dos anticorpos, desempenha importante papel na defesa contra as bactérias extracelulares. Os anticorpos podem exercer suas ações de três maneiras: 1) fazendo a opsonização, 2) ativando o sistema complemento, 3) promovendo a neutralização de bactérias ou de seus produtos (Lima & Alves 2008).

As deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas e deficiência de complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de anticorpos ou deficiência da função de células T), são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (Murphy et al. 2010).

3.4.4.1 - Resposta imune Th1 e Th2

Se de um lado já eram conhecidas as células e os mediadores envolvidos nas defesas dos humanos, só há alguns anos anteriores foi documentado o fato de que a população de células T CD4⁺ (T auxiliares) é heterogênea, sendo constituída de três subpopulações: as células Th1, Th2 e Treg. Essa observação tem contribuído bastante para o entendimento da imunopatogênese da maioria das doenças infecciosas (Machado et al. 2004; Weissenbacher et al. 2010).

É fundamental a compreensão de que tanto a resposta Th1 como a resposta Th2 são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta Th1 está relacionada à defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares e essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2; e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma

homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (Mills & McGuirk 2004; Anton et al. 2008). Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam as moléculas CD4 e CD25 (Tr) e produzem IL-10 e/ou TGF- β (Tr1 ou Th3) estão envolvidas em modular a resposta imune, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e das doenças auto-imunes (Mills & McGuirk 2004; Weissenbacher et al. 2010).

3.4.5 - Defesa imunológica no trato genital feminino:

A mucosa do trato genital apresenta muitas características imunológicas distintas e não comparáveis a outros tecidos típicos. As células epiteliais são capazes de produzir substâncias antimicrobianas como defensinas, lactoferrina e lisozima, além de expressarem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, encaminhando os antígenos e apresentando-os aos linfócitos T CD4⁺ (Lima & Alves 2008). O trato genital feminino pode ser dividido em seis sítios anatômicos e nas adolescentes o sítio conhecido como zona T, considerada como a zona de transição entre a endocérvice e a ectocérvice e está geralmente exposta na ectocérvice o que as torna mais vulneráveis às infecções bacterianas ou virais, como o HIV e HPV (Lima & Alves 2008). As respostas imunes humorais e celulares locais estimuladas por antígenos solúveis ou poliovírus inativos, nas infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, estreptococos do grupo B, herpes simples vírus tipo 2, papilomavírus humano e vírus da imunodeficiência adquirida são fracas ou ausentes, e repetidas imunizações na região intravaginal resultam em baixa imunidade local e, raramente, há uma resposta humoral sistêmica (Russel & Mestecky 2002). No trato genital feminino, as defesas imunes inatas incluem o próprio epitélio de barreira, a presença de muco, o pH ácido em torno de 4,5 mediado pela microbiota composta predominantemente de *Lactobacillus* sp e mediadores solúveis como proteínas do complemento e peptídeos antimicrobianos (Witkin et al. 2000; Lima & Alves 2008).

O trato genital de homens e mulheres apresenta sítios análogos à Placa de Peyer intestinal. No entanto, as secreções, como o fluido intestinal, contêm imunoglobulina A (IgA) como isotipo dominante, enquanto o sêmen e o fluido cérvico-vaginal contêm mais imunoglobulina G (IgG) do que IgA devido a endocérvice possuir uma grande quantidade de plasmócitos secretores de IgG, cujo produto encontra-se disperso no fluido cervical (Jackson et al. 2005; Mestecky et al. 2005).

A superfície da mucosa do trato genital, trato gastrointestinal e pulmonar compreende um sistema imune independente do sistema imune sistêmico (Mestecky et al. 2005) uma vez que os linfócitos ativados em um local da mucosa se dispersam e migram para outras mucosas, porém, respostas sistêmicas são raramente detectadas após esta estimulação local (Castle et al. 2002).

3.4.6 - Ação das citocinas nas infecções bacterianas e virais:

As bactérias presentes nas mulheres com VB estimulam a secreção de TNF- α e a expressão de RNAm codificante para TLR4 (Zariffard et al. 2005). Na associação entre níveis de citocinas, citologia vaginal e infecções vaginais verificou-se que as concentrações de IL-1 β e TNF- α foram maiores em mulheres com lesão intraepitelial cervical se comparados a indivíduos com citologia negativa (Witkin et al. 2000). A presença de mulheres infectadas pelo HIV que apresentam uma lesão intra-epitelial cervical também está associada ao aumento significativo da concentração de IL-1 β , porém não é possível afirmar que a infecção pelo HPV na cérvix poderia influenciar a patogênese do HIV induzindo a produção de fatores imunes e inflamatórios aumentando a expressão do vírus (Gage et al. 2000). Por outro lado, Tjong et al. (2001) e Zara et al. (2004) descreveram que os níveis de TNF- α e IL-1 β foram significativamente altos em mulheres com câncer cervical comparando controles com pacientes com NIC.

A presença de vaginose bacteriana pode ser claramente associada com altos níveis de TNF- α , o que parcialmente explica o mecanismo de como a presença de VB aumenta a transmissão de HIV (Sturm-Ramirez et al. 2000; Zara et al. 2004), assim como lesões persistentes causadas pela infecção por HPV também podem causar inflamação crônica durante a indução de resposta imune anti-HPV e produção de citocinas como IL-6 e IL-10 que também podem afetar a expressão do HIV (Gage et al. 2000). Os altos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Ryckman et al. 2008) ou TNF- α estão associadas com a presença de inflamação cervical, na microbiota vaginal alterada, com o pH vaginal maior que 4,5, na presença de *Gardnerella vaginalis* (GV), com o aumento do número de leucócitos identificados nos esfregaços vaginais corados pelo Gram, no uso de duchas vaginais com soluções anti-sépticas, na gravidez, com a presença de *clue cells*, com o aumento de concentração de hemoglobina na secreção, na ausência de infecção fúngica, com a idade e no uso de anticoncepcionais orais (ACO) (Platz-Christensen et al. 1993; Sturm-Ramirez et al. 2000).

Além da citocina TNF- α , os níveis de IL-12 também foram encontrados elevados em mulheres HPV positivas infectadas, também, com HIV ou outra DST (*T. vaginalis*, *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*) e notou-se que neste estudo, o aumento do pH indicativo de infecções por *T. vaginalis* estava associado com altos níveis de IL-10 e IL-12 (Crowley-Nowick et al. 2000; Gravitt et al. 2003). Em estudo epidemiológico (Zariffard et al. 2005) foram detectados marcadores de imunidade no sangue (anticorpos anti-HPV no soro), mas não em secreções locais da cérvix onde a infecção ocorre.

3.5 - Eventos que poderiam alterar as respostas do sistema imunológico:

A microbiota vaginal autóctone é complexa e sua composição varia de acordo com as alterações no sistema imunológico da mulher e a multiplicidade de eventos decorrentes em sua vida como: fatores hormonais, múltiplos parceiros, uso de anticoncepcionais orais, antibioticoterapia por infecções ocorridas em outros locais, tricomoníase, candidíase e outras DSTs como o HPV, diabetes, uso de condom ou de ACO, tabagismo e hábitos higiênicos, mudanças de pH todos considerados fatores de risco para o aparecimento de infecções genitais (Georgijevic et al. 2000; Koneman et al. 2008).

A resposta imune contra as principais DST no trato genital feminino ocasionalmente não oferece proteção adequada e não é capaz de promover memória de forma eficiente, permitindo que quadros de reinfecção se estabeleçam em curtos períodos de tempo. Existem características peculiares que demonstram a vulnerabilidade da mucosa genital feminina quando exposta a micro-organismos e agentes exógenos (Lima & Alves 2008). Sabe-se que a alteração da sua microbiota autóctone favorece a proliferação de micro-organismos potencialmente patogênicos, que frequentemente levam ao aparecimento de infecções e inflamações no ambiente vaginal (Camargo-Campos et al. 2008a; Camargo-Campos et al. 2008b). A elucidação dos componentes que interferem nessa vulnerabilidade é crucial para o desenvolvimento de vacinas ou novos fármacos que protejam o trato genital feminino contra as DST (Lima & Alves 2008).

As respostas às infecções do trato genital variam entre as mulheres, pois elas não são geneticamente análogas e não estão expostas aos mesmos ambientes. Portanto, não é possível esperar que um determinado micro-organismo induza as mesmas respostas e

ocasiona doenças idênticas em diferentes indivíduos infectados ou ainda no mesmo indivíduo, em períodos variados. Alguns fatores como a frequência da atividade sexual e prévia sensibilização a espermatozóides ou demais componentes do sêmen, também, influenciam a resposta imune (Witkin 1988).

A elucidação de como os processos infecciosos e inflamatórios ocorre na região vaginal, poderão servir de base para o melhor entendimento da patogênese dessas infecções. As citocinas locais são representativas da resposta de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) que regulam os linfócitos T citotóxicos e da resposta de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) que regulam a produção de anticorpos e são conhecidas pela sua alta efetividade na eliminação de infecções microbiológicas estabelecidas assim como relatados por Fan et al. (2008). Portanto, nesse estudo foi realizada a dosagem de citocinas no trato genital inferior de mulheres com e sem Papilomavírus humano e vaginose bacteriana.

4 - OBJETIVOS

4.1 - *Objetivo geral:*

Avaliar a produção de citocinas no trato genital inferior de mulheres com e sem Papilomavírus humano e vaginose bacteriana, atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia.

4.2 - *Objetivos específicos:*

1. Identificar os micro-organismos responsáveis pelas vaginoses bacterianas em mulheres na fase reprodutiva investigando a presença de *Gardnerella vaginalis* e demais bactérias anaeróbias e determinar os fatores extrínsecos e intrínsecos a ela relacionados.
2. Verificar a associação entre a presença de vaginose bacteriana, o pH vaginal e a infecção pelo papilomavírus humano de alto risco (HPV - 16, 18, 31, 33, 35) e de baixo risco (HPV - 6, 11) no material cérvico-vaginal.
3. Correlacionar as infecções com alguns fatores imunológicos, através da dosagem das citocinas locais (da via Th1: IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-gama, e da via Th2: IL-6 e IL-10).

5 - MATERIAL E MÉTODOS:

5.1 - Área e população de estudo:

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, o trabalho foi iniciado sendo incluídas, prospectivamente, 173 mulheres entre 16 e 48 anos, inicialmente no Serviço de Ginecologia e Mama da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) e posteriormente nas Unidades Básicas de Saúde como Centro de Assistência Integrada a Saúde (CAIS) Urias Magalhães (Distrito Sanitário Norte), Programa de Saúde da Família (PSF) Negrão de Lima (Distrito Sanitário Campinas/Centro), PSF Madre Germana II (Distrito Sanitário Sudoeste), PSF Tremendão e Barra Vento (Distrito Sanitário Noroeste) localizados em distintas regiões da cidade de Goiânia, no período de Abril de 2007 a Fevereiro de 2008. Estas mulheres foram classificadas pela cor branca, preta, parda, amarela ou indígena de acordo com as características declaradas pelas próprias mulheres entrevistadas, critério também adotado pelo último censo realizado pelo IBGE (2000) seguindo a classificação cor/raça. Porém, Pena (2005) descreve que o conceito de raça é carregado de ideologia e sempre traz consigo algo não explicitado: a relação de poder e dominação, sendo assim, “tóxico” e “contamina” a sociedade e tem sido usado para oprimir e fomentar injustiças, mesmo dentro do contexto médico.

Foram excluídos da pesquisa, pacientes do sexo feminino que não estivessem na fase reprodutiva, e que estivessem em uso de pomadas vaginais ou duchas intra-vaginais durante as 24 horas que precederam o dia da coleta, que haviam sido submetidas à conização, cauterização, quimioterapia ou radioterapia ou que não foram atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da Cidade de Goiânia.

Foi realizada a pesquisa dos casos de vaginose bacteriana confirmada através de exames clínico e laboratorial. O estudo foi conduzido baseando-se na análise das frequências dos micro-organismos causadores de infecções genitais através de dados obtidos por Camargo-Campos et al. (2008), em amostra de população semelhante. O cálculo do tamanho amostral foi feito considerando a prevalência de vaginose bacteriana de aproximadamente 25% e de mulheres com HPV vaginal de 15% nesta faixa etária estudada. Com base nesse cálculo e o poder do teste acima de 80%, o estudo

buscou incluir 157 mulheres; considerando uma perda de 10% e o número final necessário seria de 173 participantes.

5.2 - Coleta e Transporte das amostras:

Após receberem informações e consentirem em sua participação na pesquisa, um questionário foi aplicado sobre os aspectos sociais, pessoais e práticas de saúde. Em seguida o material para os exames laboratoriais foi coletado. Quando o diagnóstico laboratorial confirmasse alterações que necessitassem de intervenção médica e tratamento apropriado à mulher, assim como o seu parceiro, os mesmos receberam assistência pela rede de saúde pública do município de Goiânia-GO. Durante a aplicação do questionário verificou-se o dia correspondente a cada fase do ciclo menstrual. O dia relativo (DR) ao período de cada fase do ciclo foi identificado como: DR -4 (folicular), DR 0 (ovulação) e DR +8 (lútea) (Zara et al. 2004).

O material cérvico-vaginal foi colhido durante uma consulta médica de rotina nas Unidades de Saúde. Para a realização do exame, a paciente ficou em posição ginecológica, posicionada em uma maca, onde verificou-se o aspecto físico da mucosa vaginal. Introduziu-se o espéculo médio esterilizado descartável (Kolplast®) na vagina, realizou-se a aferição do pH vaginal com fita graduada de 3,8 a 5,4 (Merck-Sharp-Dohme®) que foi colocada em contato com a parede lateral do terço superior da mucosa vaginal durante 30 segundos. Não se utilizou qualquer elemento lubrificante para não interferir na qualidade do esfregaço e posterior cultivo para o isolamento e reconhecimento dos micro-organismos. Após a introdução do espéculo foi realizada a observação clínica da endocérvice e feita a coleta do material de acordo com o descrito por Tavares-Murta et al. (2008).

Durante a coleta foi usado um swab (CB Produtos®) para retirada da amostra do fórnice posterior, priorizando a inoculação em placa de Petri contendo agar Columbia CNA (colistina - ácido nalidíxico) com 5% de sangue humano e fazendo estrias neste meio com alça descartável esterilizada e a seguir introduzindo o swab no Caldo BHI PRAS, meio pré-reduzido e esterilizado em anaerobiose contendo hemina, vitamina K e extrato de levedura. As placas e os caldos eram imediatamente incubados em jarra de anaerobiose (Gaspak®) ($37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) por 48 a 72 horas (Murta et al. 2000). Com outro swab foi confeccionada uma lâmina com aproximadamente duas gotas de secreção vaginal à qual se adicionou 5 gotas de hidróxido de potássio (KOH) a 10%,

observando-se o odor característico da volatilização das aminas putrescina e cadaverina em amostras positivas para vaginose bacteriana e, em seguida, este swab foi introduzido em tubo contendo salina a 0,85% e então fechado com tampão de algodão (Silva et al. 2001).

As amostras retiradas da endocérvice na junção escamo-colunar (JEC) foram utilizadas para a realização do Papanicolaou e a dosagem de citocinas. Segundo Tavares-Murta et al. (2008), as concentrações das citocinas são maiores na endocérvice do que em secreções vaginais motivo pelo qual a coleta foi realizada neste sítio. Estas amostras também foram utilizadas para a pesquisa de HPV onde o material era coletado através da escova (Digene®) introduzida e girada a 360° por duas vezes. Introduziu-se a escova em um tubo de 0,5 ml contendo 0,3 ml de salina. Após quebrar a haste, o tubo foi fechado e imediatamente colocado em caixa com gelo reciclável para o transporte.

O material nas jarras foi então transportado ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP/ UFG, onde os meios de cultura e lâminas foram submetidos à análise microbiológica.

No laboratório, o tubo Eppendorf contendo a secreção vaginal foi submetido à agitação em vortex por 1 minuto. Este tubo foi, então, invertido e realizado um orifício na parte inferior do mesmo. Com cuidado foi encaixado em um outro tubo Eppendorf de 1,5 ml e submetido à centrifugação por 5 minutos a 300g. Após a centrifugação, o tubo de cima foi descartado e o volume do tubo inferior medido precisamente (anotou-se para cálculo posterior) e acertou-se o volume final para 500µl com solução salina. O volume final era aliquoteado e estocado a -70°C para posteriores dosagens das citocinas que foram realizadas no Laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia/Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM. O tubo contendo a secreção e salina a 0,85% foi utilizado para a confecção do exame a fresco e para a produção das lâminas para a coloração de Gram no IPTSP-UFG.

5.3 - Diagnóstico das vaginoses bacterianas:

No diagnóstico da vaginose bacteriana deveriam estar presentes 3 dos 4 critérios clínicos estabelecidos: leucorréia, pH maior que 4,5, teste de aminas positivo ou presença de “clue cells” (Amsel et al. 1983; Georgijevic et al. 2000).

5.3.1 - Isolamento e identificação das bactérias:

Os esfregaços das secreções vaginais corados pelo Gram foram examinados e avaliados de acordo com a classificação de Nugent et al. (1991), em microscópio óptico com aumento da objetiva de 100x, iniciando-se a leitura onde houvesse maior celularidade.

A microbiota vaginal foi classificada no esfregaço corado pelo Gram através da seguinte divisão: presença exclusiva de lactobacilos (grau 1), predomínio de lactobacilos (grau 2), presença de lactobacilos, mas predominância de outras bactérias Gram positivas ou negativas (grau 3), e ausência de lactobacilos e presença de microbiota mono ou poli bacteriana (grau 4). Considerou-se microbiota alterada quando a secreção obtida era compatível com os graus 3 e 4 desta classificação (Sturm-Ramirez et al. 2000). O caldo BHI PRAS foi incubado por 24h a 36,5°C e a seguir o material era semeado em ágar-base enriquecido com sangue de carneiro a 5% e incubado a 37°C por 24 horas e posterior observação da hemólise em placa. Nos meios com crescimento as colônias foram submetidas à coloração de Gram antes dos testes de identificação.

O cultivo e isolamento de bactérias anaeróbias foram realizados em jarra de anaerobiose: 1) em ágar contendo sangue humano a 5%; 2) em ágar Columbia acrescido de colistina e ácido nalidíxico. A identificação presuntiva foi realizada com base na morfologia celular típica da colônia pequena e beta-hemólise, em cultivo de 35°C por 24, 48 ou até 72 horas em atmosfera de 5% a 7% de CO₂ (gás carbônico) obtidas através da utilização de um sachê para anaerobiose (Anaerobac, PROBAC®). A identificação de bactérias anaeróbias era realizada através das seguintes provas bioquímicas: fermentação da sacarose, manitol, maltose, glicose e lactose, produção de gelatinase, urease, VM, indol, motilidade e teste rápido do hipurato (Koneman et al. 2008).

5.4 - Dosagem de citocinas:

5.4.1 - Quantificação de citocinas: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Para assegurar a analogia entre estudos, os ensaios foram estandarizados com uma citocina padrão comercialmente disponível (BD®). As citocinas IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-gama, IL-6, IL-8 e IL-10 foram quantificadas usando Kit ELISA (BD®) comercialmente padronizado. Devido à sensibilidade e instabilidade desta citocina à temperatura ambiente ela foi a primeira a ser dosada, assim como realizados por Sturm-

Ramirez et al. (2000). Estas citocinas foram escolhidas por serem moléculas importantes na regulação da cascata da inflamação em ambiente vaginal.

O Kit de ELISA foi utilizado para medir as concentrações dessas citocinas no material cérvico-vaginal. Após testá-lo de acordo com as instruções do fabricante, era preciso calcular o fator de diluição necessário para medir o menor e o maior limite de detecção de cada citocina. Todos os testes com amostras e controles foram realizados em duplicata.

As citocinas presentes na secreção vaginal estocada a -70°C não sofreram processo de descongelamento até serem dosadas por ELISA utilizando pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis. Utilizaram-se placas de 384 poços de fundo chato, em que foram sensibilizados com os anticorpos monoclonais específicos para a captura da citocina que seria dosada. Portanto, foram adicionados 100ul do anticorpo (Ac) de captura diluído em tampão diluente de Carbonato de Sódio (*coating buffer*) (1:250 – Ac : solução). Incubou-se a placa durante a noite a 4°C . Após, foram aspirados os poços e lavados por 3 vezes com 75 ul de solução de lavagem (PBS-Tween a 5%) e inverteu-se a placa em papel absorvente para remover os restos de tampão. Em seguida realizou-se o bloqueio da placa com $\geq 50\text{ul/poço}$ de tampão diluente de PBS com soro bovino fetal. Incubou-se em temperatura ambiente por 1 hora. Dois poços foram utilizados para o branco da reação. Às fileiras 1 e 2 de cada placa foram adicionados 25 μl de citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 em solução salina tamponada com tampão diluente de PBS com soro bovino fetal a partir das concentrações iniciais diluídas. Às outras fileiras foram adicionados 25 $\mu\text{l/poço}$ da secreção vaginal contendo a citocina diluída no momento da coleta e calculado o fator de diluição. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por duas hora e lavadas por 6 vezes com a mesma solução de lavagem. A seguir, adicionou-se 25 $\mu\text{l/poço}$ do anticorpo anti-citocina (anticorpo de detecção) a ser dosada, marcado com biotina, diluído 1: 250 em tampão diluente de PBS com soro bovino fetal, e acrescentou-se a enzima marcada com avidina. As placas foram reincubadas por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por 6 vezes em PBS-T, quando então foi adicionado 25 $\mu\text{l/poço}$ de substrato DNP (TMB) (BD OptEIATM - TMB Substrate Reagent Set) incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Adicionou-se 50 μl de solução de parada, ácido fosfórico a 5%, em cada poço. Os resultados foram obtidos pela diferença entre as absorbâncias obtidas a 570 e 450 nm (Abs 570 - Abs 450) medida em um leitor automático de ELISA (Spectra Max Plus 384). A

concentração de citocinas nos sobrenadantes determinada em pg/ml através da comparação com as absorbâncias obtidas em uma curva padrão da respectiva citocina recombinante era realizada simultaneamente (Zara et al. 2004; Maisuradze et al. 2005).

5.5 - Tipagem do HPV

5.5.1 - Extração do DNA

A secreção vaginal coletada das pacientes também foi utilizada para extração do DNA. Dos 500µl iniciais da amostra, 100µl foram diluídos em 1,0 ml de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (TRIZOL[®]).

Neste novo tubo era realizada a separação das fases adicionando 200µL de clorofórmio para cada 1,0 mL de TRIZOL[®] coletado na amostra, com posterior agitação em vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. No final da centrifugação houve a separação da mistura em uma fase inferior vermelho-fenol-clorofórmio e em outra incolor aquosa na parte superior. A fase aquosa foi então transferida para outro tubo e a fase fenólica submetida à extração de DNA. Foram adicionados 300µL de etanol 100% com posterior agitação em vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por cerca de 2 a 3 minutos e centrifugação a 2.000g por 5 minutos a 4°C.

Após a centrifugação houve a separação da amostra em duas fases, sendo que o DNA foi encontrado na fase sólida do tubo, o sobrenadante foi removido e em seguida realizada a lavagem do DNA por suspensão em 1,0 ml de citrato de sódio 0,1M a 10% de etanol, com posterior homogeneização em vórtex por 15 segundos e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugação a 2.000g por 5 minutos a 4°C. Após as duas lavagens, adicionou-se 1ml de etanol 75% e incubou-se por 20 minutos a temperatura ambiente, logo em seguida foi centrifugado a 2.000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado (Maisuradze et al. 2005; Crapolicchio et al. 2006).

A seguir, o material era incubado a 4°C por 48 horas, para secagem do sedimento. Após a obtenção do DNA sedimentado, este foi diluído em 100 µL de NaOH a 8 mM, para melhor dissolução do material e armazenado no freezer a 0°C para posterior realização da PCR.

5.5.2 - PCR para HPV

Para realização da PCR adicionou-se ao DNA diluído em NaOH a 8mM em uma solução mix para PCR.

As reações de PCR foram feitas seguindo o protocolo descrito pelo fabricante da enzima (Invitrogen[®], Carlsbad, California, EUA), contudo, as temperaturas de anelamento assim como os mixes para cada sequência iniciadora, as etapas e número de ciclos para a realização das PCRs foram otimizadas por prévias padronizações realizadas no IPON da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

De modo geral, ao tubo contendo DNA foi adicionado a uma solução contendo os seguintes componentes para amplificação: Tampão 10x, dNTP, MgCl₂, Taq DNA polimerase, Primer F 10 mM, Primer R 10 mM e água ultra pura. Porém as concentrações dos reagentes e as temperaturas utilizadas para as reações de amplificação se encontram descritas abaixo.

Componentes para amplificação de HPV com volume final de 25,0µl:

- Tampão 10x-----2,5µl
- MgCl₂ 50mM-----1,10µl
- dntp 10mM-----1,00µl
- *primer* F 10mM -----0,75µl
- *primer* R 10mM -----0,75µl
- DNA -----10,0µl
- H₂O Milli Q q.s.p-----para 25,0µl
- Taq DNA polimerase 5U/µl -----0,15µl

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos para DNA de HPV.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	Tamanho do Produto Amplificado	Temperatura de Anelamento	Referência
HPV- baixo risco (6,11)	5'=5'...TACACTGCTGGACAACA TGC...3' 3'=5'...GTGCGCAGATGGGACAC AC...3'	302 pb	58°C	(Sarkar FH et al. 1990)
HPV- alto risco (16,18,31,33,35)	5'=5'...TTTGTACTGTGGTAGAT ACTAC...3' 3'=5'... GAAAAATAAACTGTAAATCATA TTC...3'	175pb	42°C	(Sarkar FH et al. 1990)

5.5.3 - Ciclo de Amplificação de DNA

Para o HPV de alto risco a reação era iniciada em 94°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação, posteriormente de 45 segundos a temperatura de anelamento 42°C e 1 minuto de polimerização a 72°C e posteriormente mais 10 minutos nesta temperatura e finalmente resfriado a 16°C. Para o HPV de baixo risco a reação foi iniciada em 92°C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação, posteriormente de 45 segundos a temperatura de anelamento 58°C e 45 segundos de polimerização a 72°C, posteriormente mais 15 minutos nesta temperatura e finalmente resfriado a 16°C. A reação era amplificada utilizando um termociclador - Eppendorff[®] com 96 orifícios (Crapolicchio et al. 2006).

5.5.4 - Detecção dos Produtos Amplificados

Após a reação de PCR, os produtos da amplificação foram misturados com 5µl de tampão de amostra e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 90 volts por 2 horas e corados com nitrato de prata a 2%. Foi utilizado um padrão de peso molecular de 50pb em cada gel de corrida (TrackitTM 50pb DNA ladder da Invitrogen[®]). Posteriormente a corrida eletroforética, colocou-se o gel em solução fixadora por 15

minutos, esta solução era desprezada e em seguida adicionada ao gel uma solução de Nitrato de Prata a 2% por 15 minutos sob agitação mecânica, seguido de uma lavagem rápida em água Milli-Q e incubação em solução reveladora por aproximadamente 15 minutos, retornando o gel para a solução fixadora por 15 minutos. Após a revelação do gel realizou-se a análise da presença das bandas de 302pb para HPV de baixo risco e de 175pb para HPV de alto risco (Tamin et al. 2002; Crapolicchio et al. 2006).

5.6 - Análise Estatística:

Realizou-se a análise estatística descritiva, incluindo distribuições de frequência de dados categóricos. A prevalência foi calculada para refletir a frequência relativa de infecções genitais, com intervalos de confiança (IC) de 95%. Odds ratio e IC95% foram calculados em análise univariada e multivariada para estimar o poder de associação entre a presença de VB e cada comportamento de risco em potencial através dos testes qui-quadrado, Mann-Whitney e Teste T de Student. Os principais fatores de risco foram avaliados com 5% como o valor de p crítico para a entrada de variáveis (Centeno et al. 1999).

6 – RESULTADOS

De 173 mulheres estudadas, 47 (27,2%) apresentaram vaginose bacteriana (VB) e 47 (27,2%) apresentaram infecções pelo HPV. Entre as pacientes com VB, a maioria era de cor parda e 10 (47,6%) eram negras. No grupo com VB, 20 mulheres não utilizavam métodos de barreira sexual e 19 (40,4%) utilizavam ACO. Do total de mulheres examinadas, a maioria era casada, sendo: 75,0% no grupo controle, 68,1% no grupo com VB ($p=0,344$), 61,7% naquelas com HPV ($p=0,065$); 64,5% no grupo com HPV de alto risco ($p=0,236$) e 54,5% entre as com HPV de baixo risco ($p=0,057$). Foram encontrados 31 casos de pacientes com HPV de alto risco e 22 casos com HPV de baixo risco, porém 6 mulheres apresentavam as duas formas de HPV, totalizando 47. No total de 47 mulheres com VB e 47 com HPV, a maioria possuía menos de duas gestações, não era abortiva, nem tabagista e não fazia o uso de duchas vaginais, com resultados não estatisticamente significativos. Nos grupos, com VB ou com HPV, a presença de câncer de colo uterino na família, não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Do total de mulheres examinadas, a não utilização de condom como fator de risco para estas intercorrências vaginais, também não mostrou resultados estatisticamente significativos e apresentaram os seguintes resultados: 25,0% no grupo controle, 27,1% dentre as com VB ($p=0,512$), 28,5% no grupo com HPV ($p=0,303$), 18,8% entre as com HPV de alto risco ($p=0,399$) e 13,2% no grupo com HPV de baixo risco ($p=0,502$), as demais características encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Fatores comportamentais e fisiológicos das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO, de acordo com a análise univariada.

Fatores de risco	Presença de VB				Presença de HPV				HPV alto risco				HPV baixo risco			
	n (%)	OR	IC	p	n (%)	OR	IC	p	n (%)	OR	IC	p	n (%)	OR	IC	p
Idade > 30 anos	23 (48,9)	0,696	0,35-1,36	0,187	25 (26,0)	0,880	0,45-1,72	0,420	20 (20,8)	1,579	0,70-3,53	0,180	8 (8,3)	0,409	0,16-1,03	0,045
Menarca <14 anos	42 (93,3)	0,346	0,09-1,23	0,068	41 (29,5)	0,228	0,05-1,02	0,026	28 (20,1)	0,180	0,02-1,39	0,051	19 (13,7)	0,287	0,04-2,26	0,183
Sexarca <16 anos	19 (42,2)	1,021	0,51-2,05	0,549	21 (30,4)	0,708	0,35-1,43	0,215	17 (24,6)	0,453	0,20-1,03	0,043	11 (11,8)	0,894	0,35-2,29	0,500
Paridade >2	9 (19,1)	0,758	0,33-1,75	0,332	5 (12,8)	0,322	0,12-0,88	0,015	4 (10,3)	0,453	0,15-1,38	0,116	1 (2,6)	0,142	0,02-1,09	0,020
Ensino Médio ou Superior	27 (60,0)	1,154	0,57-2,33	0,414	28 (30,4)	1,688	0,81-3,52	0,111	16 (17,4)	0,892	0,43-2,24	0,564	16 (17,4)	3,368	1,07-0,58	0,024
Parceiros >1 nos últimos 5anos	29 (61,7)	3,424	1,70-6,88	<0,001	19 (27,5)	1,018	0,51-2,02	0,547	12 (17,4)	0,931	0,42-2,06	0,514	10 (14,5)	1,285	0,52-3,16	0,373
nº coitos >3 por semana	19 (40,4)	3,039	1,45-6,35	0,003	12 (28,6)	1,097	0,51-2,38	0,479	7 (16,7)	0,892	0,35-2,25	0,506	5 (11,9)	0,906	0,31-2,63	0,547
DST atual	2 (4,3)	5,556	0,49-62,76	0,048	1 (33,3)	1,348	0,20-15,22	0,616	1 (33,3)	2,333	0,20-26,57	0,449	0 (0,0)	0,980	0,96-1,00	0,663
pH>4,5	37 (78,7)	5,194	2,37-11,37	<0,001	34 (72,3)	3,329	1,60-6,91	0,001	23 (74,2)	3,267	1,37-7,80	0,005	16 (72,7)	2,813	1,04-7,58	0,029
Casadas	32 (68,1)	0,806	0,39-1,67	0,344	29 (61,7%)	0,537	0,26-1,10	0,065	20 (64,5)	0,677	0,30-1,54	0,236	12 (54,5)	0,425	0,17-1,06	0,057

VB: Vaginose bacteriana, HPV: Papilomavírus humano, n: número total, OR=odds ratio, IC=intervalo de confiança de 95%, p<0,05

Na análise realizada pela citologia oncótica, dos 47 casos positivos para vaginose bacteriana, em 41 foram encontradas *clue cells*, sugestivo de VB e nos outros 6 a predominância de lactobacilos. A coloração de Gram mostrou maior sensibilidade no diagnóstico de VB com 95,8% de concordância entre dados clínicos e microbiológicos. Na realização da cultura bacteriana em anaerobiose, foram identificados 42 (24,3%) casos com *Gardnerella vaginalis* e 149 (86,1%) com demais anaeróbios. Ao se analisar os dados obtidos, através da regressão logística multivariada os fatores de risco independentes para a presença de VB ou de HPV encontram-se representados na Tabela 2.

Tabela 2: Fatores comportamentais e fisiológicos das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO, de acordo com a análise multivariada.

Fatores de risco	Presença de VB			Presença de HPV			HPV alto risco		
	p	OR	IC	p	OR	IC	p	OR	IC
nº coitos >3 por semana	0,002	3,01	1,34 - 7,12	-	-	-	-	-	-
Parceiros >1 últimos 5anos	< 0,001	3,54	1,65 - 7,63	-	-	-	-	-	-
Casado	-	-	-	0,029	0,43	0,20 - 0,96	-	-	-
pH≥4,5	-	-	-	< 0,001	4,23	1,87 - 9,60	0,006	3,39	1,34 - 8,54

VB: Vaginose bacteriana, OR: *odds ratio*, IC: Intervalo de confiança (95,0%), p<0,15

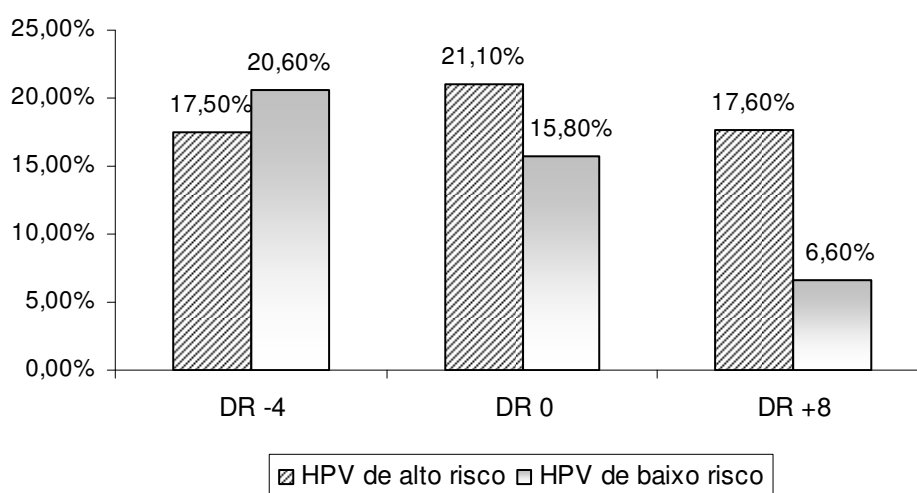
Entre as mulheres examinadas, verificou se haveria a possibilidade de existir uma associação entre a presença de VB e de HPV. Entre as 47 pacientes com HPV, 12 (25,5%) delas apresentavam VB e das 126 sem VB, 41 (32,5%) possuíam HPV com $p = 0,373$. Entre as mulheres que apresentavam HPV de alto risco 8 (17,0%) tinham VB enquanto que 23 (18,2%) casos de HPV de alto risco nas que não apresentavam VB ($p = 0,850$). Nas que possuíam HPV de baixo risco 5 (10,6%) tinham VB versus 17 (13,5%) casos de HPV no grupo sem VB com $p = 0,616$.

As mulheres estudadas foram divididas em grupos, baseando-se nas suas características clínicas e microbiológicas. Em mulheres com microbiota normal (grupo controle) foram visualizados *Lactobacillus* sp em 104 (60,1%) além de outros bacilos e cocos Gram positivos. Nos casos positivos para VB foram encontrados: *Gardnerella vaginalis* em 41 (87,2%), *Prevotella* sp em 20 (42,5%) e *Clostridium* sp em 7 (14,9%) seguidos de outros anaeróbios. Nos 32 casos de candidíase com presença em sua maioria de pseudohifas foram verificados *Candida albicans* em 23 (71,9%), *C. glabrata*

em 5 (38,5%) e *C. parapsilosis* em 3 (9,4%). Nos casos de vaginite bacteriana observou-se *Staphylococcus cohnii* em 5 (38,5%), *S. aureus* em 3 (23,0%) e *Escherichia coli* em 2 deles (15,4%), além de outras enterobactérias e estafilococos. Verificou-se também a presença de *Trichomonas vaginalis* em 5 (2,9%) do total de mulheres estudadas.

Dentre os 43 casos de *Gardnerella vaginalis* identificados através da cultura, 11 (25,6%), possuíam HPV, já no grupo sem GV foram observados resultados semelhantes com 36 (27,7%) casos ($p=0,787$). O mesmo foi aplicado comparando-se o grupo com e sem a presença de bactérias anaeróbias em que 43 (27,0%) dos que apresentavam anaeróbios possuíam HPV, resultado próximo ao grupo sem identificação de anaeróbios que foi de 28,6% com $p=0,902$. Entre as mulheres examinadas 63 (36,4%) estavam na fase proliferativa DR -4, 19 (11,0%) na ovulatória DR 0 e 91 (52,6%) na lútea DR+8. Foram encontrados 26 (31,7%) casos de HPV do total de 82 mulheres nas fases proliferativa e ovulatória em e 21 (23,1%) casos de HPV daquelas 91 na fase lútea, $p=0,135$ (Gráfico 1).

Figura 1: Análise da frequência de HPV de alto risco (16,18,31,33,35) e baixo risco (6,11) durante o ciclo menstrual das mulheres analisadas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Goiânia-GO.



DR: Dia relativo; HPV alto risco $n=31$, $\chi^2=0,138$, $p=0,933$; HPV baixo risco $n=22$, $\chi^2=6,872$, $p=0,032$.

Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α e todas eram comparadas à sua concentração em relação ao grupo controle. Destas, somente as IL-2, IL-6 e IL-12 apresentaram resultados estatisticamente significativos na presença de HPV e de vaginose bacteriana. Os resultados das concentrações de todas as citocinas encontram-se nas tabelas 3, 4, 5 e 6 abaixo.

Tabela 3: Concentração de citocinas em mulheres com vaginose bacteriana.

Citocinas	Controle	Com VB			
	Mediana n=60	Mediana n= 47	Intervalo Interquartil 25%-75%	Mann-Whitney	p
IL-2	20,64	47,84	21,92 - 90,58	838,00	0,009
IL-6	626114,00	976056,67	423058,00 - 1328030,00	2339,50	0,034
IL-10	106345,00	100763,33	53167,50 - 235352,00	2942,00	0,948
IL-12	44,30	104,10	47,13 - 255,60	554,00	0,006
TNF-α	37522,33	40996,00	19520,00 - 75638,33	2840,50	0,681
IFN-γ	22,30	30,52	8,99 - 74,03	1527,00	0,188

Abreviações: [] em pg/ml, IL-2, interleucina 2; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ , interferon gama; VB, vaginose bacteriana; p<0,05

Tabela 4: Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano.

Citocinas	Controle	Com HPV			
	Mediana n=60	Mediana n= 47	Intervalo Interquartil 25%-75%	Mann-Whitney	p
IL-2	20,64	40,13	24,32 - 77,78	833,00	0,022
IL-6	626114,00	979056,60	384215,00 - 1191236,00	2863,00	0,738
IL-10	106345,00	124421,67	79730,00 - 256985,00	2412,00	0,061
IL-12	44,30	92,34	48,12 - 146,30	681,00	0,020
TNF-α	37522,33	40818,00	20278,80 - 66633,70	2777,00	0,530
IFN-γ	22,30	17,30	0,50 - 60,69	1631,00	0,564

Abreviações: [] em pg/ml, IL-2, interleucina 2; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ , interferon gama; HPV, papilomavírus humano; p<0,05

Tabela 5: Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano de alto risco.

Citocinas	Controle	HPV alto risco			
	Mediana n=60	Mediana n= 47	Intervalo Interquartil 25%-75%	Mann-Whitney	p
IL-2	20,64	39,33	23,61 - 85,75	551,00	0,047
IL-6	626114,00	892700,00	139417,50 - 1169692,50	2107,00	0,710
IL-10	106345,00	149976,60	85887,50 - 323270,00	1714,50	0,054
IL-12	44,30	92,34	38,93 - 143,0	467,00	0,134
TNF-α	37522,33	36085,00	19520,00 - 62321,20	2102,50	0,696
IFN-γ	22,30	7,49	0,50 - 32,10	855,00	0,053

Abreviações: [] em pg/ml, IL-2, interleucina 2; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ , interferon gama; HPV, papilomavírus humano; p<0,05

Tabela 6: Concentração de citocinas em mulheres com Papilomavírus humano de baixo risco.

Citocinas	Controle	HPV baixo risco			
	Mediana n=60	Mediana n= 47	Intervalo Interquartil 25%-75%	Mann-Whitney	p
IL-2	20,64	40,13	24,05 - 91,69	408,00	0,133
IL-6	626114,00	1038345,00	639512,20 - 1216118,00	1395,00	0,226
IL-10	106345,00	131007,50	70959,20 - 269020,00	1533,00	0,560
IL-12	44,30	112,70	53,99 - 177,90	264,00	0,029
TNF-α	37522,33	48166,50	28185,40 - 76172,10	1345,50	0,150
IFN-γ	22,30	37,43	3,50 - 78,66	692,50	0,319

Abreviações: [] em pg/ml, IL-2, interleucina 2; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ , interferon gama; HPV, papilomavírus humano; p<0,05

7 – DISCUSSÃO

Observando as características gerais do grupo de mulheres estudadas nesta pesquisa, verificou-se que o maior contingente de mulheres atendidas encontrava-se abaixo de 30 anos, demonstrando que a demanda nestes postos de saúde foi constituída por um grupo predominantemente jovem, casadas, que utilizavam condom e com grau de escolaridade mediano dentro dos padrões do município de Goiânia-GO. O fato de esta população ser composta por mulheres com um grau elevado de escolaridade e de utilizarem condom (Campos et al. 2008) podem ser considerados fatores positivos em relação aos conhecimentos sobre prevenção aos cuidados à saúde da mulher, porém a maioria delas principalmente as do grupo VB positivo, disse ter mais de um parceiro sexual nos últimos cinco anos, ter mais de 3 relações sexuais por semana e apresentava algum tipo de DST no momento da coleta, sendo estes achados significantes. Assim como os verificados em mulheres com HPV em que a sexarca e menarca precoces e à paridade maior que dois aumentariam as chances de contaminação pelo vírus HPV, com resultados estatisticamente significativos, estes fatores também descritos por Barcelos et al. (2008).

Além disso, nesta amostragem foram encontradas elevadas incidências de VB e HPV, se comparado a outro estudo anterior relatado, onde a coleta foi realizada no HAJ da ACCG, por Camargo-Campos et al. (2008)a e b, provavelmente devido ao fato de a coleta atual ter sido realizada em postos de saúde onde é o primeiro local de procura pelas mulheres para solucionar problemas de cunho primário e no anterior em serviço terciário. A alta taxa destas doenças infecciosas associada a estes fatores de risco mostra a necessidade de campanhas educacionais sobre o comportamento sexual, direcionada a mulheres com parceiros estáveis ou não (Barcelos et al. 2008).

A maior parte das mulheres atendidas era de cor parda e entre as negras foi encontrado um alto índice de VB. Ryckman et al. (2008), mostraram uma incidência de VB três vezes maior em mulheres negras, além do alto índice de gravidez prematura, maior uso de cigarros, maior número de parceiros sexuais e mais episódios de VB anteriores do que em brancas, onde foram verificados que entre os dois grupos quando apresentavam microbiota normal, as de cor branca possuíam uma maior concentração de IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-12 do que ao outro grupo, o que possivelmente explica a razão pelas quais as negras apresentaram maior frequência de VB independente dos fatores de risco associados.

Nesta pesquisa não foi encontrada diferença significativa entre as mulheres com e sem VB ou HPV quanto ao uso de cigarros, duchas vaginais, medicamentos, número de gestações, abortos, presença familiar de câncer de colo uterino e uso de ACO por tempo prolongado, demonstrando uma população homogênea entre os grupos, assim como relatado por Camargo-Campos et al. (2008), porém naquele estudo o uso de ACO por mais de 5 anos para alterações induzidas pelo HPV foi um fator estatisticamente significativo o que difere de nossos resultados atuais. Fato este provavelmente explicado devido ao grupo anterior ter sido coletado em amostragem diferenciada ou também por ter sido observado somente as alterações citológicas induzidas pelo HPV, sem a utilização de PCR para pesquisa de HPV.

Na citologia oncológica é possível identificar a presença de *clue cells* associada a VB como relatados por Martin et al. (1999), Murta et al. (2000); Adad et al. (2001). Porém, a realização de esfregaços corados pelo método de Gram seguindo-se os critérios de Amsel et al. (1983) e Nielson et al. (2004), esta metodologia mostrou-se muito mais sensível para este achado. Quando realizado em associação com a cultura de micro-organismos anaeróbios. Ao se analisar a regressão logística multivariada entre os fatores de risco verificados isolados, os fatores de risco independentes para a presença de VB foram: ter mais de um parceiro sexual nos últimos 5 anos e ter mais de 3 relações sexuais por semana. Já na presença de HPV os fatores independentes foram: estado civil casado e pH >4,5 e no caso de ser HPV de alto risco o único fator considerado independente foi o pH > 4,5, como observado também por Barcelos et al. (2008).

Os principais micro-organismos relacionados ao aparecimento de infecções genitais entre as mulheres examinadas foram: bactérias anaeróbias como *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus cohnii*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Trichomonas vaginalis* o que condiz com os estudos de Di Bartolomeo et al. (2002), Donders et al. (2002), Edwards (2004) e Camargo-Campos et al. (2008).

Alterações da microbiota vaginal como a presença de achados de “clue cells” sugestivas de VB ocorrem com frequência significativamente maior em mulheres com anormalidades citológicas cervicais, onde também há uma maior frequência de HPV devido à produção de nitrosaminas pelas bactérias anaeróbias e o estímulo à produção de citocinas como a IL-1 β (Crapolicchio et al. 2006), embora neste estudo, não houve a associação entre a presença de *Gardnerella vaginalis* p = 0,890, *Prevotella* sp p = 0,150 ou das demais bactérias anaeróbias p = 0,840 na mucosa vaginal e a presença do HPV.

Considerando-se que em alguns estudos a presença de VB, cervicite e NIC podem frequentemente ligados, as pacientes com VB e NIC poderiam apresentar perfis similares em suas respostas imunes locais (Tavares-Murta et al. 2008). Contradizendo estudos anteriores também não houve diferença significativa de associação entre a presença de HPV em mulheres com vaginose bacteriana. Porém, sabe-se que um dos fatores mais comuns entre mulheres com VB é a alcalinização do pH vaginal (Silva et al. 2004), assim neste estudo foi encontrado um resultado estatisticamente significativo para esta condição, em que mulheres com $\text{pH} > 4,5$ estariam predispostas ao aparecimento de infecções por HPV de alto e baixo risco, resultados demonstrados também por Barcelos et al. (2008), que relatam que a mudança do pH vaginal, como na VB, poderia favorecer o aparecimento de infecções pelo HPV.

As mulheres adultas são mais suscetíveis às DSTs durante a fase folicular, e possuem menor chance de serem infectadas durante a fase lútea (Hildesheim et al. 1999; Nowicki et al. 2000). Como as adolescentes são hiperresponsivas a estrógenos, níveis hormonais podem ter uma grande influência na imunidade do trato genital durante a maturação puberal, elevando o risco de infecção nas adolescentes sexualmente ativas, entre os fatores biológicos destacam-se também a maior exposição da mucosa genital feminina aos fluidos seminais e nas adolescentes pós-menarca, a imaturidade do colo uterino associada a um pH vaginal elevado (Shrier et al. 2003; Lima & Alves 2008). Neste estudo, a maior parte das mulheres analisadas estava na fase lútea do ciclo menstrual, porém a maior frequência do HPV foi observado nas que estavam na fase folicular e ovulatória principalmente para os casos de HPV de baixo risco, confirmando também os achados de Campos et al. 2008, que relatou a ocorrência de uma variação de HPV vaginal durante o ciclo, com maiores valores no período pré-menstrual.

Nosso estudo mostrou que a coleta de secreção da endocérvice é um método confiável e que permite a detecção da concentração de citocinas no trato genital. Observou-se também, um aumento na concentração de IL-10 na presença de infecções genitais pelo HPV principalmente em casos de HPV de alto risco, sendo este resultado estatisticamente significativo. Já os níveis de IL-12 também foram altos na presença de infecções pelo HPV e entre aquelas que tinham contaminação pelo HPV de baixo risco os resultados eram significativos. Segundo Castle et al. 2002, as concentrações de IL-10 e IL-12 parecem estar correlacionadas com infecção cervical prévia pelo HPV ou outros patógenos como o HIV, que podem prejudicar a integridade da barreira epitelial e levar à acumulação de proteínas séricas nas secreções cervicais (Crowley-Nowick et al.

2000), no entanto, Gravitt et al. (2003) não tenha encontrado esta associação em seus resultados com mulheres com HPV, onde o aumento de IL-12 foi verificado somente quando das infecções pelo HPV e HIV foram concomitantes.

As concentrações de IL-10 também se mostraram correlacionadas à contaminação devido a alta concentração de hemácias na secreção cervical (produção local), mas não a concentração de IL-12 (produção sistêmica), demonstrando a independência da imunidade de mucosa da cérvix e sugerindo que a produção local de citocina é importante para a regulação da imunidade do trato genital (Hildesheim et al. 1999; Castle et al. 2002). Gravitt et al. (2003) relataram que o aumento de IL-12 foi encontrado em mulheres com pH aumentado característico de mulheres com VB, o que condiz com os nossos resultados, pois infecções crônicas normalmente elevam o número de infiltração linfocítica que poderia satisfatoriamente explicar o aumento destas citocinas com a elevação do pH vaginal.

No entanto, Crowley-Nowick et al. (2000) e Fan et al. (2008) descrevem que a concentração de IL-2 não está associada à presença de HPV, HIV, VB ou outras DST's e sugerem que os níveis de citocinas no trato genital produzem uma resposta imune do tipo TH2 e que os níveis de IL-2 não se encontram aumentados nestes pacientes, provavelmente devido a esta citocina ser produzida previamente às demais e ser esta rapidamente degradada. Porém, verificou-se um aumento significativo desta citocina na presença de VB, HPV total e HPV de alto risco, demonstrando que a coleta foi eficazmente realizada e a dosagem obtida antes de uma provável degradação da IL-2.

De acordo com a literatura, a presença de NIC I, II, III ou câncer cervical estão associados a altos níveis de IL-6 e IL-8, ou seja, estas citocinas encontram-se diretamente associadas com tumores cervicais e estão associadas a prognósticos ruins (Tavares-Murta et al. 2008). Este mesmo autor relata também aumentos significativos de IL-6, IL-8 e IL-10 em mulheres com VB e de IL-8 no estudo realizado por Hattori et al. (2007). No estudo atual, foi observado um aumento significativo de IL-6 em mulheres com VB com resultados estatisticamente significativos e um aumento de IL-10 embora no limite da significância em mulheres com HPV total e HPV de alto risco se comparados ao grupo controle. Já na presença de VB a IL-10 não mostrou resultado estatisticamente significativos, assim como descritos por Weissenbacher et al. (2010).

Os níveis de IFN- γ em mulheres com HPV de alto risco apresentaram-se bem inferiores se comparados ao do grupo controle, com resultados também próximos aos estatisticamente significativos. Segundo estudo anterior, a presença de HPV associada à

regressão das lesões cervicais pode ser um resultado de uma resposta Th1 e o desenvolvimento destas lesões relacionado à (aumento de IL-8 e IFN- γ). O aumento dos níveis de IL-10 em cultura de linfócitos T está em concordância com a hipótese que imunossuppressores de citocinas Th2 possivelmente promoveriam o desenvolvimento de tumores (Tavares-Murta et al. 2008).

O aumento nos níveis de TNF- α não apresentou resultado estatisticamente significativo entre a presença de VB e o grupo controle assim como no estudo relatado por Hedges et al. (2006). Este mesmo estudo constatou que ocorre um aumento local de citocinas quando há presença de bactérias anaeróbias tais como *Gardnerella* sp e *Prevotella* sp, com escala de Nugent >4 isto, se comparado ao grupo onde há a presença maciça de *Lactobacillus* sp. Confirmando, Sturm-Ramirez et al. (2000) verificaram também um aumento da citocina pró inflamatória TNF- α e leucócitos em mulheres com VB onde a presença de “clue cells” e pH>4,5 foram considerados bons indicadores de presença de GV confirmadas pela cultura. É necessário observar, no entanto, que a não relação entre altos níveis de TNF- α e a presença de VB observada aqui, necessitaria de ser replicada com um maior número de participantes a fim de demonstrar que os resultados obtidos por estes grupos realmente não seriam estatisticamente significativos.

8 - CONCLUSÕES

Nesta população de mulheres composta por 173 mulheres entre 16 e 48 anos de idade, por meio da análise multivariada, pôde-se concluir que ter mais de um parceiro sexual nos últimos 5 anos e realizar mais de 3 relações sexuais por semana são fatores independentes associados à presença de VB. Já na presença de HPV os fatores independentes foram: estado civil casado e $\text{pH} > 4,5$ e no caso de ser HPV de alto risco o único fator considerado independente foi o $\text{pH} > 4,5$.

Foi verificado também que a principal bactéria responsável pela presença de VB foi a *Gardnerella vaginalis*, seguidos pela *Prevotella* sp e *Clostridium* sp, embora estes micro-organismos não tenham apresentado significância estatística quanto à sua associação direta com o aparecimento de infecções pelo HPV. Porém, a alcalinização do pH vaginal, possivelmente predispõe ao aparecimento de infecções genitais pelo HPV e esta mudança do pH com valores superiores a 4,5 é frequentemente encontrada em mulheres com vaginose bacteriana, embora neste estudo não tenha sido demonstrando correlação direta entre HPV e VB, GV ou a demais bactérias anaeróbias. A detecção do Papilomavírus humano de alto e baixo risco foram maiores nas fases proliferativa e ovariana do ciclo menstrual.

Ao se relacionar as infecções pelo HPV de alto e baixo risco e pela presença de VB com alguns fatores imunológicos, através da dosagem das citocinas locais, verificou-se que a resposta imunológica Th1 com produção de IL-2, IL-12 e IFN- γ esteve aumentada na presença de infecções vaginais pelo HPV. Enquanto que na presença de VB as citocinas aumentadas foram as IL-2, IL-12 e a IL-6, demonstrando assim, respostas imunológicas semelhantes em infecções por HPV e a presença de VB.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adad SJ, de Lima RV, Sawan ZT, Silva ML, de Souza MA, Saldanha JC, Falco Aguiar VA, Cunha AH, Murta EFC 2001. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med J* 119(6):200-205.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK 1983. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 74(1):14-22.

Anton G, Rid J, Mylonas I, Friese K, Weissenbacher ER 2008. Evidence of a TH1-Shift of Local Vaginal Inflammatory Response During Bacterial Vaginosis. *Infection* 36(2):147-152.

Austin MN, Beigi RH, Meyn LA, Hillier SL 2005. Microbiologic Response to Treatment of Bacterial Vaginosis with Topical Clindamycin or Metronidazole. *J Clin Microbiol* 43(9):4492–4497.

Barcelos MRB, Vargas PRM, Baroni C, Miranda AE 2008. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: prevalência e fatores de risco. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30(7):349-354.

Campos A, Amaral E, Levi JE, Portugal P, Villarroel M, Bezerra KC, Silva MTN, Morais SS 2008. Carga viral vaginal de HIV em mulheres brasileiras infectadas pelo HIV. *Rev Assoc Med Bras* 54(1):67-71.

Camargo-Campos AC, Freitas-Junior R, Ribeiro LFJ, Paulinelli RR, Reis C 2008a. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis/ Prevalência de vulvovaginite e vaginose bacteriana em pacientes com coilocitose. *Sao Paulo Med J* 126(6):333-336.

Camargo-Campos AC, Freitas-Junior R, Poletto KQ, Goulart EF, Jubé LF, Paulinelli RR, Reis C 2008b. Fatores de risco associados às alterações celulares induzidas pelo papilomavirus humano no colo uterino. *Rev Ciênc Méd Camp* 17(3-6):133-140.

Cauci S, Driussi S, Guaschino S, Isola M, Quadrifoglio F 2002. Correlation of local interleukin-1 β levels with specific IgA response against *Gardnerella vaginalis* cytolysin in women with bacterial vaginosis. *Am J Reprod Immunol* 47(5):257-264.

Carvalho RJV, Cunha CM, Silva DAO, Sapelete MC, Urzedo JE, Moreira TA, Moraes PSA, Taketomi EA 2003. IgA, IgE e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. *Rev. Assoc. Med. Bras* 49(4):434-438.

Castle PE, Hildesheim A, Bowman FP, Strickler HD, Walker JL, Pustilnik T, Edwards RP, Crowley-Nowick PA 2002. Cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin Immunol* 22(1):23-27.

Centeno AJ 1999. Distribuição e teste de χ^2 . In Centeno AJ, *Curso de estatística aplicada à Biologia*, Goiânia. p. 193-209.

Crapolicchio A, Simone G, Caponio MA, Fumarola L, Monno R 2006. Detection of human papilloma virus in women attending the IRCCS, Ospedale oncologico Bari, Southern Italy: preliminary data. *New Microbiol* 29(1):69-73.

Crowley-Nowick PA, Ellenberg JH, Vermund SH, Douglas SD, Holland CA, Moscicki AB 2000. Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: Impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. *J Infect Dis* 181:939-945.

Di Bartolomeo S, Rodriguez FM, Sauka DH, Alberto TR 2002. Prevalencia de microorganismos asociados a secreción genital femenina, Argentina. *Rev Saude Publica* 36(5):545-552.

Discacciati MG, Rabelo-Santos SH, Campos EA, Simões JA, Derchain SFM, Sarian LOZ, Zeferino LC 2004. Vaginose Bacteriana e DNA de Papilomavírus Humano de Alto Risco Oncogênico em Mulheres Submetidas a Conização com Alça Diatérmica para Tratamento de Neoplasia Intra-epitelial Cervical de Alto Grau. *Rev Bras Ginecol Obstet* 26(9):721-725.

Donders GG, Vereecken A, Dekeersmaecker A, Van Bulck B, Spitz B 2000. Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary flora better than Gram stain. *J Clin Pathol* 53(4):308-313.

Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B 2002. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 109(1):34-43.

Edwards L 2004. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Dermatol Ther* 17(1):102-10.

Fan SR, Liu XP, Liao QP 2008. Human defenses and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis. *Int Gynaecol Obstet* 103(1):50-54.

Gage JR, Sandhu AK, Nihira M, Bonecini-Almeida M da G, Cristoforoni P, Kishimoto T, Montz FJ, Martinez-Maza O 2000. Effects of human papillomavirus-associated cells on human immunodeficiency virus gene expression. *Obstet Gynecol* 96(6):879-885.

Georgijevic A, Cjukic-Ivancevic S, Bujko M 2000. Bacterial vaginosis. Epidemiology and risk factors. *Srp Arh Celok Lek* 128(1-2):29-33.

Gravitt PE, Hildesheim A, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Morera LA, Cardenas F, Bowman FP, Shah KV, Crowley-Nowick PA 2003. Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions. *J Clin Immunol* 23(3):175-183.

Greca LM, Zanine RM 2004. Vaginose bacteriana. *Femina* 32(8):659-662.

Hattori Y, Nakanishi T, Ozaki Y, Nozawa K, Sato T, Sugiura-Ogasawara M 2007. Uterine cervical inflammatory cytokines, interleukin-6 and -8, as predictors of miscarriage in recurrent cases. *Am J Reprod Immunol* 58(4):350-357.

Hedges S R, Barrientes F, Desmond R A, Schwebke J R 2006. Local and Systemic Cytokine Levels in Relation to Changes in Vaginal Flora. *J Infect Dis* 193:556-562

Hildesheim A, McShane L M, Schiffman M, Bratti M C, Rodriguez A C, Herrero R, Morera L A, Cardenas F, Saxon L, Bowman F P, Crowley-Nowick P A 1999. Cytokine

and immunoglobulin concentrations in cervical secretions: reproducibility of the Weck-cel collection instrument and correlates of immune measures. *J Immunol Methods* 225:(1-2)131–143.

IBGE.com.br. [homepage on the Internet]. Rio de Janeiro: Distribuição da população por cor ou raça, Pesquisa nacional por amostra de domicílios 1999 [updated 2000; cited 2010 Feb 9]. Available from: <http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/tabela1.shtm#a112>

Jackson S, Mestecky J, Moldoveanu Z, Spearman P 2005. Appendix I: Collection and processing of human mucosal secretions. In *Mucosal immunology*, 3rd edn, J Mestecky, J Bienenstock, ME Lamm, L Mayer, JR McGhee, W Strober (eds). Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 1829 - 1839.

Jeremias J, Mockel S, Witkin SS 1998. Human semen induces interleukin 10 and 70 kDa heat shock protein gene transcription and inhibits interferon-gamma messenger RNA production in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Hum Reprod* 4(11):1084-1088.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schrelenberger PC, Winn-Jr WC 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora MEDSI 1450p.

Kutteh WH, Moldoveanu Z, Mestecky J 1998. Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(suppl):51–55.

Lee BN, Follen M, Shen DY, Malpica A, Adler-Storthz K, Shearer WT, Reuben JM 2004. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:(2)239-244.

Lima YAR, Alves MFC 2008. O sistema imune da mucosa do trato genital feminino e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis. *Rev Patol Tropic* 37(4):295-309.

Machado PRL, Araújo IASA, Carvalho L, Carvalho EM 2004. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol* 79(6):647-664.

Maisuradze NZ, Sanikidze TV, Topuria MD, Museridze NG 2005. Oxidative processes in the cervical and vaginal epithelial tissue in patients with HPV infection. *Georgian Med News* 120(3):30-33.

Martin H L, Jr, Richardson B A, Nyange P M, Lavreys L, Hillier S L, Chohan B, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Bwayo J, Kreiss J 1999. Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition. *J Infect Dis* 180(6):1863–1868.

McNicol PJ, Paraskevas M, Guijon FB 1999. The effect of vaginal microbes on in vivo and in vitro expression of human papillomavirus 16 E6-E7 genes. *Cancer Detec Prev* 23(1):13-21.

Mestecky J, Moldoveanu Z, Russell MW 2005. Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *Am J Reprod Immunol* 53(5):208-214.

Mills KH, McGuirk P 2004. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol*.16(2):107-117.

Mitchell CM, Balkus J, Agnew KJ, Cohn S, Luque A, Lawler R, Coombs RW, Hitti JE 2008. Bacterial vaginosis, not HIV, is primarily responsible for increased vaginal concentrations of proinflammatory cytokines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24(5):667-671.

Murphy k, Travers P, Walport M 2010. Imunobiologia de Janeway. 7th ed. Editora Artmed 908p.

Murta EFC, Souza MAH, Araújo Jr E, Adad SJ 2000. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological. *Sao Paulo Med J* 118(4):105-108.

Nielson SEO, Mesquita AJ, Souza BEM, Reis C 2004. Diagnóstico de vaginoses em mulheres assintomáticas atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia-GO, de fevereiro a março de 2001. *Rev Patol Trop* 33(3):291-300.

Nowicki S, Tassell AH, Nowicki B 2000. Susceptibility to gonococcal infection during the menstrual cycle. *JAMA* 283(10):1291-1292.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL 1991. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 29(2):297-301.

Oliveira F A, Pflieger V, Lang K, Heukelbach J, Miralles I, Fraga F, Sousa A Q, Stoffler-Meilicke M, Ignatius R, Kerr L F S, Feldmeier H 2007. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(6): 751-756.

Pena S D J 2005. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* 12(2):321-346.

Platz-Christensen JJ, Pernevi P, Hagmar B, Andersson E, Brandberg A, Wiquist N 1993. A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72:(2)99-102.

Platz-Christensen JJ, Mattsby-Baltzer I, Thomsen P, Wiquist N 1993. Endotoxin and interleukin-1 alpha in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 169(5):1161-1166.

Ryckman KK, Williams SM, Krohn MA, Simhan HN 2008. Racial differences in cervical cytokine concentrations between pregnant women with and without bacterial vaginosis. *J Reprod Immunol* 78(2):166-171.

Russell MW, Mestecky J 2002. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes Infect* 4(6):667-677.

Sarkar FH, Crissman JD 1990. Detection of human papilloma virus DNA sequences by polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9(2):180-185.

Shrier LA, Bowman FP, Lin M, Crowley-Nowick PA 2003. Mucosal immunity of the adolescent female genital tract. *J Adolesc Health* 32(3):183-186.

Silva WM, Miranda CRR, Freitas MJC, Pessoa ARS, Lauand A, Lima RM 2001. Vaginose bacteriana em mulheres com infertilidade e em menopausadas. *Rev. Bras. Ginecol Obstet* 23(10):641-646.

Silva CS, Adad SJ, Souza MAH, Barcelos ACM, Terra APS, Murta EFC 2004. Increased frequency of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* in pregnant women with human Papilloma virus infection. *Gynecol Obstet Invest* 58:(4)189-193.

Sturm-Ramirez K, Gaye-Diallo A, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ 2000. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 182(2):467-473.

Tavares-Murta BM, Resende AD, Cunha FQ, Murta EFC 2008. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138(1):93-99.

Tjiong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MP, ten Kate FW, Out TA 2001. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 14(6):357-360.

Watts DH, Fazarri M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, Glesby M, Levine AM, Burk R, Palefsky JM, Moxley M, Ahdieh-Grant L, Strickler HD 2005. Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1–Infected and High-Risk HIV-1–Uninfected Women. *J Infect Dis* 191:(7)1129–1139.

Weissenbacher T, Walter C, Mylonas I, Scholz C, Ginkelmaier A, Friese K 2010. Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 281:77–80.

Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L 2005. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 206:306-335.

Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ 2000. Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 183(1):252-256.

Witkin SS 1988. Production of interferon gamma by lymphocytes exposed to antibody-coated spermatozoa: a mechanism for sperm antibody production in females. *Fertil Steril* 50(3):498-502.

World Health Organization (WHO) 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: WHO.

Yamamoto LSU, Alves VAF, Maeda MYS, Longatto-Filho A, Utagawa ML, Eluf Neto J 2004. Padronização da análise de critérios citomorfológicos de lesões associadas à infecção pelo HPV. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 46(4):189-193.

Zara F, Nappi RE, Brerra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A 2004. Markers of local immunity in cervico-vaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect* 80(2):108-112.

Zariffard MR, Novak RM, Lurain N, Sha BE, Graham P, Spear GT 2005. Induction of tumor necrosis factor- alpha secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 191(11):1913-1921.

Artigo científico enviado à American Journal of Reproductive Immunology. As normas para publicação estão em anexo.

Evaluation of cytokines in vaginal secretions from women with bacterial vaginosis associated with human papillomavirus

Ana Claudia Camargo Campos¹, Eddie Fernando Candido Murta², Márcia Antoniazi Michelin³, Cleomenes Reis⁴

Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiás, Brazil

1. MsTM, Department of Microbiology at the Institute of Tropical Pathology and Public Health - Federal University of Goiás, Goiânia-GO.
2. MD PhD, Oncology Research Institute/Discipline of Gynecology and Obstetrics. - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba-MG.
3. PhD, Oncology Research Institute/Discipline of Immunology. - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba-MG.
4. PhD Department of Microbiology at the Institute of Tropical Pathology and Public Health - Federal University of Goiás, Goiânia-GO.

Address for correspondence:

MsTM. Ana Claudia Camargo Campos

Avenue Portugal number 248 Apartament. 504 Ed. Ouro Preto, Setor Oeste,

Post Code: 74140 020 Goiânia - GO, Brazil

Tel: (5562) 8151-8424 Fax: (5562) 3243-7244

e-mail:anaucg@yahoo.com.br

Abstract

Problem: The objective of our research was to evaluate cytokine production in endocervical secretions of women with bacterial vaginosis (BV) associated with human papillomavirus (HPV). **Method of study:** The study included 173 women between 16 and 48 years old treated at the Basic-Health Units, Goiânia. The women were divided into three groups: those with BV, those with HPV and healthy women (control). Cultured and identified were done, the vaginal pH was measured. The PCR by high- and low-risk strains of HPV and the levels of cytokines were determined to: IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha and IFN-gamma. The data were analyzed by Mann-Whitney tests. We identified 47 cases of BV that were unrelated to HPV infection. However, a vaginal pH > 4.5 showed a correlation with HPV. IL-2 and IL-12 were significantly elevated in cases of BV and HPV. The IL-6 was high only for HPV, followed by IFN-gamma and IL-10 although the last two showed a trend towards statistical significance in HPV cases. **Conclusion:** The alkalization of the vaginal pH was probably a predisposing factor for the appearance of HPV, and the immune response Th1-type cytokines in vaginal secretions in the presence of BV and/or HPV may also be similar.

Key-words: bacterial vaginosis, citokines, humam papillomavírus

Introduction

The vagina and the cervix are the first lines of physical and immunological defense against sexually transmitted pathogens.^{1,2} However, the infectious processes in the vagina caused by potentially pathogenic microorganisms such as protozoans, yeast, bacteria and viruses are similar in that they result from a profuse growth of these agents that can increase vaginal secretion, irritation, vulvar pruritus and generally also a fetid odor.^{1,3}

Bacterial vaginosis (BV) of undefined etiology is an inflammatory and recurring syndrome of the lower genital tract of women.^{4,5} BV is characterized by an alteration in the vaginal flora in which normally predominant lactobacilli are replaced by various microorganisms, with an increase in species such as *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* sp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum* and followed by an increase in the vaginal pH.^{5,6} These bacteria are capable of producing proteases that degrade mucus secreted into the cervix, thus breaching the protective chemical barrier of the vaginal and cervical epithelium.² BV is considered the most prevalent vaginal infection in women of reproductive age.⁵

The human papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted DNA virus and is the principle causative agent in the development of cervical tumors.⁷ The microorganisms that colonize the vagina are somehow associated with the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), which contributes to HPV infection.⁸⁻¹⁰

The defense against foreign microorganisms, such as viruses or bacteria, is mediated by the innate and adaptive immune responses.¹¹ The effector phases of innate and adaptive immunity are frequently mediated by peptide hormones termed cytokines.² In innate immunity, effector cytokines, for the most part, are produced by mononuclear phagocytes, whereas in adaptive immunity, they are produced by activated T lymphocytes that are capable of inducing inflammatory reactions abundant in neutrophils, which serve to contain and, when possible, eradicate microbial infections.^{12,13} As many of these cytokines are produced by certain populations of leukocytes trafficking directly from the bloodstream, such as monocytes, neutrophils or eosinophils, they are known as interleukins.¹¹

The elucidation of how the infectious and inflammatory processes occur in the vaginal region will serve as a basis for better understanding the pathogenesis these infections. We chose the localized cytokines IL-2, IL-12, TNF- α and IFN- γ because they are representative of a type 1 T-helper lymphocyte (Th1) response that regulates cytotoxic T lymphocytes, which are responsible for clearing infections in the genital tract. We chose the cytokines IL-6 and IL-10 because their concentrations are commonly used as markers of a type 2 T-helper lymphocyte (Th2) response that regulates the production of antibodies. A Th2 response is also known for being highly effective in clearing established microbial infections. Therefore, we measured the levels of cytokines in the lower genital tract of women with and without human papillomavirus and bacterial vaginosis in this study.

Materials and Methods

After the project approval by the Committee of Ethics for Human and Animal Research of the Clinical Hospital at the Federal University of Goiás, the work was initiated. The study included, prospectively, 173 women between 16 and 48 years of age, initially in the Gynecology and Breast Service of the Goiás Anticancer Association and subsequently at Basic Health Units located in distinct regions of the city of Goiânia, in the period from April 2007 to February 2008.

After a patient received information and consented to participate in the study, the material from the posterior fornix was subsequently collected and immediately inoculated into Columbia-CNA (colistin–nalidixic acid) agar with 5% human blood and BHI-PRAS broth, using pre-reduced and anaerobically sterilized media supplemented with hemin, vitamin K and yeast extract. The plates and broth were immediately incubated in an anaerobic jar ($37.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) for 48 to 72 hours.⁸ In addition, we measured the vaginal pH, performed an amine test,⁵ and prepared histological slides for a Pap Smear and a Gram stain.

The samples removed from the endocervix at the SCJ using a gynecological brush were used to determine the cytokine levels and the presence of high-risk and low-risk HPV. In the laboratory, the culture media and slides underwent microbiological analysis. A tube containing the endocervical secretion was centrifuged, aliquoted and stored in a freezer at -70°C .

To define bacterial vaginosis, three of the four established clinical criteria should be present: leucorrhea, pH greater than 4.5, positive amine test or the presence of “clue cells”.⁴ The presumptive identification was made based on a typical colony morphology of a small colony and beta-hemolysis, when cultured at 35°C for up to 72 hours in an atmosphere of 5% to 7% CO₂. The carbohydrate fermentation, motility and rapid hippurate tests were done.¹⁴

The cytokines present in the endocervical secretion stored at -70°C were determined by ELISA using pairs of commercially available monoclonal antibodies. The ELISAs for the samples and controls were done in duplicate at the Oncology Research Institute/UFTM. We used standard recombinant cytokines and the endocervical secretions, serially diluted 1:2 in buffered saline solution with a buffered diluent of PBS with fetal bovine serum (*assay diluent*) from the initial diluted concentrations, following the manufacturer’s recommendations. The results were obtained from the difference between the absorbances obtained at 405 and 490 nm. The concentration of cytokines in the supernatants was determined in picograms per milliliter by comparing the absorbances obtained in a standard curve of the respective recombinant cytokine, which were performed simultaneously.¹⁵

We diluted 100 µl of the initial 500-µl sample in TRIZOL® to extract DNA according to the manufacturer’s instructions (Invitrogen®, Carlsbad, California, the USA). The annealing temperatures, the mixes for each starter sequence, the stages and the number of cycles for the PCR reactions were previously optimized and standardized with a final volume of 50.0 µl. We identified the presence of low-risk HPV strains 6 and 11 (40 cycles) and high-risk HPV strains 16, 18, 31, 33 and 35 (35 cycles) using the primers 3’ to 5’ TACACTGCTGGACAACATGC and 5’ to 3’ ACACAGGGTAGACG CGTG, for low-risk HPV (6 and 11) and 3’ to 5’ TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC and 5’ to 3’ CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG for high-risk HPV (16, 18, 31, 33, 35), as previously used.¹⁶ After the PCR reactions, the amplified products were mixed with 5µl of sample buffer and analyzed by polyacrylamide gel (10%) electrophoresis at 90 volts for 2 hours and stained with 2% silver nitrate. A standard 50-bp molecular weight marker was used for each gel (Trackit™ 50 bp DNA ladder, Invitrogen®). The gel was then analyzed for the presence of certain banding patterns.¹⁷

We performed descriptive statistical analyses, including the distributions of the frequency of categorical data. The prevalence was calculated to reflect the relative frequency of genital infections using confidence intervals (CI) and odds ratios. We also

used the chi-squared, Mann–Whitney. The main risk factors were assessed with 5% as the critical p value for the input variables.

Results

Of the 173 women in the study, 47 (27.2%) presented with bacterial vaginosis. In the oncotic cytology analysis, we found “clue cells” in 41 of the 47 of them. The remaining six patients showed a predominance of lactobacillus. The Gram staining exhibited a greater sensitivity for diagnosing BV, with an agreement of 95.8% between clinical and microbiological data. From the anaerobic bacterial cultures, we identified 42 (24.3%) cases of *Gardnerella vaginalis* and 149 (86.1%) with various anaerobic bacteria. Among the women examined, we observed that among of 47 patients with HPV, 12 (25.5%) presented with BV, while there were 41 cases (32.5%) of HPV in the 126 women without BV ($p=0.373$). Among the women who presented high-risk HPV, 8 (17.0%) presented with BV, whereas 23 (18.2%) cases of high-risk HPV did not present with BV ($p=0.850$). In those women with low-risk HPV, 5 (10.6%) had BV versus 17 (13.5%) without BV ($p=0.616$).

The women were divided into groups based on their clinical and microbiological characteristics. One hundred four (60.1%) women presented with a normal flora (control group) consisting of *Lactobacillus* sp. in addition to other bacilli and Gram-positive cocci. In 47 BV-positive cases we found *Gardnerella vaginalis* (GV) in 41 patients (87.2%), *Prevotella* sp. in 20 patients (42.5%) and *Clostridium* sp. in 7 patients (14.9%), in addition to other anaerobes. Among the 41 cases of GV we identified from culture, 11 (26.8%) had HPV, and in the group without GV we observed a similar rate of 27.7% (36 cases) ($p=0.787$). The same comparisons were made for the group with and without the presence of anaerobic bacteria. Forty-three (27.0%) of the women who presented with anaerobes had HPV, which was similar to those in which we did not identify anaerobes (28.6%) ($p=0.902$). However, when we analyzed the association between vaginal pH > 4.5 and HPV infection, the results were statistically significant ($p=0.001$) for both high-risk HPV ($p=0.005$) and low-risk HPV ($p=0.029$).

The levels of the cytokines IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α were compared with their corresponding concentrations in the control group. Only IL-2, IL-6 and IL-12 were statistically significant in the presence of HPV and bacterial vaginosis. All of the cytokine concentrations are found in Tables 1, 2, 3 and 4.

Table I: Concentration of cytokines in women with bacterial vaginosis.

Cytokines	Control	BV	25%-75% percentile	Mann-Whitney	p
	Median	Median			
IL-2	20.64	47.84	21.92 - 90.58	838.00	0.009
IL-6	626114.00	976056.67	423058.00 - 1328030.00	2339.50	0.034
IL-10	106345.00	100763.33	53167.50 - 235352.00	2942.00	0.948
IL-12	44.30	104.10	47.13 - 255.60	554.00	0.006
TNF-α	37522.33	40996.00	19520.00 - 75638.33	2840.50	0.681
IFN-γ	22.30	30.52	8.99 - 74.03	1527.00	0.188

Abbreviations: IL-2, interleukin 2; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IFN- γ , interferon gamma; BV, bacterial vaginosis; p<0,05

Table II: Concentration of cytokines in women with HPV.

Cytokines	Control	HPV	25%-75% percentile	Mann-Whitney	p
	Median	Median			
IL-2	20.64	40.13	24.32 - 77.78	833.00	0.022
IL-6	626114.00	979056.60	384215.00 - 1191236.00	2863.00	0.738
IL-10	106345.00	142421.60	79730.00 - 256985.00	2412.00	0.061
IL-12	44.30	92.34	48.12 - 146.30	681.00	0.020
TNF-α	37522.33	40818.00	20278.80 - 66633.70	2777.00	0.530
IFN-γ	22.30	17.30	0.50 - 60.69	1631.00	0.564

Abbreviations: IL-2, interleukin 2; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IFN- γ , interferon gamma; HPV, human papillomavirus; p<0,05

Table III: Concentration of cytokines in women with HPV high-risk.

Cytokines	Control	HPV high-risk			
	Median	Median	25 %-75% percentile	Mann-Whitney	p
IL-2	20.64	39.33	23.61 - 85.75	551.00	0.047
IL-6	626114.00	892700.00	139417.50 - 1169692.50	2107.00	0.710
IL-10	106345.00	149976.60	85887.50 - 323270.00	1714.50	0.054
IL-12	44.30	92.34	38.93 - 143.00	467.00	0.134
TNF-α	37522.33	36085.00	19520.00 -62321.20	2102.50	0.696
IFN-γ	22.30	7.49	0.50 - 32.10	855.00	0.053

Abbreviations: IL-2, interleukin 2; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IFN- γ , interferon gamma; HPV, human papillomavírus; p<0,05

Table IV: Concentration of cytokines in women with HPV low risk.

Cytokines	Control	HPV low risk			
	Median	Median	25 %-75% percentile	Mann-Whitney	p
IL-2	20.64	40.13	24.05 - 91.69	408.00	0.133
IL-6	626114.00	1038345.00	639512.20 - 1216118.00	1395.00	0.226
IL-10	106345.00	131007.50	70959.20 - 269020.00	1533.00	0.560
IL-12	44.30	112.70	53.99 - 177.90	264.00	0.029
TNF-α	37522.33	48166.50	28185.40 - 76172.10	1345.50	0.150
IFN-γ	22.30	37.43	3.50 - 78.66	692.50	0.319

Abbreviations: IL-2, interleukin 2; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IFN- γ , interferon gamma; HPV, human papillomavírus; p<0,05

Discussion

In this sampling, we found elevated incidences of BV and HPV compared with a previous study reported.⁵ This may be because the actual collection was done at the Basic-Health Units, which is the first place women come with primary health care concerns and follow-up visits after tertiary care services.

Oncotic cytology can be used to identify the presence of “clue cells” associated with BV.^{8,18} However, when comparing the identification of “clue cells” to Gram stain smears following the criteria previously described,^{5,19} the Gram stain method was much more sensitive to detect BV. This illustrates the importance of performing these tests in conjunction with culturing anaerobic microorganisms.

The anaerobic bacterium *Gardnerella vaginalis* was the predominant and the main microorganisms associated with the appearance of bacterial vaginosis in the women examined. These results are consistent with others previous studies.^{3,5,20}

Changes in the vaginal flora, such as the presence of “clue cells,” suggest that BV occurs with a significantly higher frequency in women with cervical cytological abnormalities. There is also a higher frequency of HPV, due to production of nitrosamines by anaerobic bacteria in these abnormalities, as well as the stimulation of the production of cytokines such as IL-1 β .¹⁷ However, in our study, we did not find an association between the presence of *Gardnerella vaginalis* ($p=0.890$), *Prevotella* sp. ($p=0.150$) or other anaerobic bacteria ($p=0.840$) in the vaginal mucosa and the presence of HPV.

Considering that the presence of BV, cervicitis and CIN have frequently been associated in some studies, the patients with BV and CIN may present with similar profiles in their localized immune response.¹⁴ Unlike previous studies, we did not see a significant association between the presence of HPV and bacterial vaginosis. However, one of the most common factors among women with BV is the alkalization of the vaginal pH.⁵ Accordingly, we found a statistically significant association between pH and HPV in this study, where women with a $pH > 4.5$ were predisposed to the appearance of high and low-risk HPV infections,^{17,21} and that increased vaginal pH, such as in cases of BV, may favor the appearance of infections due to HPV.

Our study shows that the collection of endocervix secretion is a reliable, highly reproducible method that allows for the detection of cytokine concentrations in the genital tract.² We also observed a statistically significant increase in the concentration of

IL-10 in the presence of genital HPV infections, mainly in cases of high-risk HPV. The levels of IL-12 were also significantly higher in the presence of high-risk HPV infections and among those infected with low-risk HPV. The concentrations of IL-10 and IL-12 seem to be correlated with a previous cervical HPV infection or other pathogens such as HIV that can compromise the integrity of the epithelial barrier and lead to accumulation of serum proteins in cervical.²² However, another study did not find this association in their results for women with HPV, where an increase in IL-12 was only seen when there was a co-infection with HIV.²³

The concentrations of IL-10 also correlated with a high concentration of contaminating red blood cells in cervical secretions (local production), but not in the concentration of IL-12 (systemic production). This demonstrates the independence of the mucosal immunity of the cervix and suggests that the local production of cytokines is important for the regulation of immunity in the genital tract.²² Researchers have reported that an increase in IL-12 was found in women with increased vaginal pH, characteristic of women with BV,^{23,24} which is consistent with our results. Therefore, chronic infections normally that elevate the number of lymphocytic infiltrates may provide a reasonable explanation for the increase of these cytokines with an increase in the vaginal pH.

The concentration of IL-2 is not associated with presence of HPV, HIV or other STDs and suggested that the cytokine levels in the genital tract produce a Th2-type immune response. They also suggest that the levels of IL-2 are not increased in these patients, probably because this cytokine is produced before the others and then rapidly degraded.¹² However, we observed a significant increase of this cytokine in the presence of BV, total HPV and high-risk HPV, demonstrating that the collection was performed efficiently and the levels were obtained before the probable degradation of IL-2.

According to the literature, the presence of CIN I, II or III or cervical cancer are associated with high levels of IL-6 and IL-8. In other words, these cytokines are directly associated with the development of cervical tumors and are associated with a bad prognosis.^{14,25} These same authors also report significant increases in IL-6, IL-8 and IL-10 in women with BV. In our study, we observed a significant increase in the levels of IL-6 in women with BV and a trend towards significantly higher levels of IL-10 in women with total HPV or with high-risk HPV compared to the control group.

The levels of IFN- γ in women with high-risk HPV were well below those of the control group, although this was not statistically significant. According to a previous

study, the presence of HPV associated with the regression of cervical lesions may be the result of a Th1 response (increased IL-8 and decreased IFN- γ). The increase in the levels of IL-10 from T lymphocytes in culture supports the hypothesis that the immunosuppression of Th2 cytokines may promote the development of tumors.¹⁴

The increases in TNF- α were not statistically significant between the BV-positive and -negative subjects.²⁶ Due to the sensitivity and instability of this cytokine in ambient temperatures, we measured it first, as suggested by Sturm-Ramirez et al. (2000).⁴ Studies found a localized increase in cytokines with the presence of anaerobic bacteria such as *Gardnerella* sp. and *Prevotella* sp., with a Nugent score > 4, when compared to a group with an abundance of *Lactobacillus* sp.²⁶ Consistent with researchers findings, that have also reported an increase in TNF- α and leukocytes in women with BV in whom the presence of “clue cells” and pH > 4.5 were considered good indicators of the presence of GV, which was confirmed by culturing.⁴ We need to point out, however, that we did not observe a relationship between high levels of TNF- α and the presence of BV. This would require another experiment with a larger number of participants to demonstrate that the results obtained for these groups are indeed not statistically significant.

We can conclude that the main bacterium responsible for the presence of BV is *Gardnerella vaginalis*, followed by *Prevotella* sp. and *Clostridium* sp., even though the presence of these microorganisms was not significantly associated with the appearance of HPV infections. The alkalization of vaginal pH may predispose one to the appearance of genital HPV infections, and this change towards pH values greater than 4.5 is frequently found in women with bacterial vaginosis. By comparing the levels of localized cytokines among high-risk HPV, low-risk HPV and BV infections, we found that a Th1 immunological response with the production of IL-2, IL-12 and IFN- γ increased in the presence of HPV vaginal infections, whereas in BV, the levels of the cytokines IL-2, IL-12 and IL-6 increased, demonstrating that there are similar immunological responses to HPV and to BV infections.

References

1. Gage JR, Sandhu AK, Nihira M, Bonecini-Almeida M da G, Cristoforoni P, Kishimoto T, Montz FJ, Martinez-Maza O: Effects of human papillomavirus -

- associated cells on human immunodeficiency virus gene expression. *Obstet Gynecol* 2000; 96:879-885.
2. Fan SR, Liu XP, Liao QP: Human defenses and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis. *Int Gynaecol Obstet* 2008; 103:50-54.
 3. Edwards L: The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Dermatol Ther* 2004; 17:102-10.
 4. Sturm-Ramirez K, Gaye-Diallo A, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ: High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000; 182:467-473.
 5. Camargo-Campos AC, Freitas-Junior R, Ribeiro LFJ, Paulinelli RR, Reis C: Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis/ Prevalência de vulvovaginite e vaginose bacteriana em pacientes com coilocitose. *Sao Paulo Med J* 2008; 126:333-336.
 6. Silva CS, Adad SJ, Souza MAH, Barcelos ACM, Terra APS, Murta EFC: Increased frequency of bacterial vaginosis and Chlamydia trachomatis in pregnant women with human Papilloma virus infection. *Gynecol Obstet Invest* 2004; 58:189-193.
 7. Watts DH, Fazarri M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, Glesby M, Levine AM, Burk R, Palefsky JM, Moxley M, Ahdieh-Grant L, Strickler HD: Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1–Infected and High-Risk HIV-1–Uninfected Women. *J Infect Dis* 2005; 191:1129–1139.
 8. Murta EFC, Souza MAH, Araújo Jr E, Adad SJ: Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological. *Sao Paulo Med J* 2000; 118:105-108.

9. Platz-Christensen JJ, Mattsby-Baltzer I, Thomsen P, Wiqvist N: Endotoxin and interleukin-1 alpha in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:1161-1166.
10. Discacciati MG, Simoes JA, Lopes ES, Silva SM, Montemor EBL, Rabelo-Santos SH, Westin MCA: Is bacterial vaginosis associated with squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix. *Diagn Cytopathol* 2006; 34:323-325.
11. Anton G, Rid J, Mylonas I, Friese K, Weissenbacher ER: Weissenbacher. Evidence of a TH1-Shift of Local Vaginal Inflammatory Response During Bacterial Vaginosis. *Infection* 2008; 36:147-152.
12. Crowley-Nowick PA, Ellenberg JH, Vermund SH, Douglas SD, Holland CA, Moscicki AB: Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: Impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. *J Infect Dis* 2000; 181:939–945.
13. Roeters AME, Boon ME, van Haaften M, Vernooij F, Bontekoe TR, Heintz APM: Inflammatory events as detected in cervical smears and squamous intraepithelial lesions. *Diagn Cytopathol* 2010; 38: 85-93.
14. Tavares-Murta BM, Resende AD, Cunha FQ, Murta EFC: Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 138:93-99.
15. Maisuradze NZ, Sanikidze TV, Topuria MD, Museridze NG: Oxidative processes in the cervical and vaginal epithelial tissue in patients with HPV infection. *Georgian Med News* 2005; 120:30-33.
16. Sarkar FH, Crissman JD: Detection of human papilloma virus DNA sequences by polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990; 9:180-185.

17. Crapolicchio A, Simone G, Caponio MA, Fumarola L, Monno R: Detection of human papilloma virus in women attending the IRCCS, Ospedale oncologico Bari, Southern Italy: preliminary data. *New Microbiol* 2006; 29:69-73.
18. Adad SJ, de Lima RV, Sawan ZT, Silva ML, de Souza MA, Saldanha JC, Falco Aguiar VA, Cunha AH, Murta EFC: Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med J* 2001; 119:200-205.
19. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK: Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74:14-22.
20. Vaca M, Guadalupe I, Erazo S, Tinizaray K, Chico ME, Cooper PJ, Hay P: High prevalence of bacterial vaginosis in adolescent girls in a tropical area of Ecuador. *An Int J Obste Gynaecol* 2010; 117: 225-228.
21. Mania-Pramanik J, Kerkar SC, Mehta PB, Potdar S, Salvi VS: Use of vaginal pH in diagnosis of infections and its association with reproductive manifestations. *J Clin Lab Anal* 2008; 22: 375-379.
22. Castle PE, Hildesheim A, Bowman FP, Strickler HD, Walker JL, Pustilnik T, Edwards RP, Crowley-Nowick PA: Cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin Immunol* 2002; 22:23-27.
23. Gravitt PE, Hildesheim A, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Morera LA, Cardenas F, Bowman FP, Shah KV, Crowley-Nowick PA: Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions. *J Clin Immunol* 2003; 23:175-183.

24. Weissenbacher T, Walter C, Mylonas I, Scholz C, Ginkelmaier A, Friese K: Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281:77–80.
25. Hattori Y, Nakanishi T, Ozaki Y, Nozawa K, Sato T, Sugiura-Ogasawara M: Uterine cervical inflammatory cytokines, interleukin-6 and -8, as predictors of miscarriage in recurrent cases. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:350-357.
26. Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR: Local and Systemic Cytokine Levels in Relation to Changes in Vaginal Flora. *J Infect Dis* 2006; 193:556-562.



HOME / MEDICINE, NURSING & DENTISTRY / ALLERGY & CLINICAL IMMUNOLOGY / GENERAL ALLERGY & CLINICAL IMMUNOLOGY /



American Journal of Reproductive Immunology

[Official Journal of the American Society for Reproductive Immunology](#)

Edited by:
Gil Mor

Print ISSN: 1046-7408

Online ISSN: 1600-0897

Frequency: Monthly

Current Volume: 65 / 2011

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2009: Immunology: 89 / 128; Reproductive Biology: 14 / 26

Impact Factor: 2.172

TopAuthor Guidelines

Please read carefully. Failure to conform to standards outlined here may delay processing.

1. Online Submission - [click here](#) to submit your manuscript

2. The journal publishes information covering the area of reproductive immunology.

3. The journal is now operating an electronic editorial office. It is therefore recommended that manuscripts are submitted online via <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri>. Detailed instructions and advice are available on the ScholarOne Manuscripts website. The manuscript must include a structured abstract, references, figures, legends, and tables. Please use the assigned reference number in correspondence. Submission of a manuscript will automatically represent that the authors have appropriate authorization from laboratory directors, department chairs, and/or grantees if such authorization is required. Submission is representation that the manuscript has not been published previously and is not currently under consideration for publication elsewhere. All submitted manuscripts must be accompanied by a completed Copyright Transfer Agreement (licensing copyright to Wiley-Wiley-Blackwell). The Copyright Transfer Agreement can be downloaded at <http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf>

Return address for CTAs is as follows:

American Journal of Reproductive Immunology

Editorial Office Editorial Manager

LSOG 305a Department of Obstetrics Gynecology and Reproductive Science

Yale University School of Medicine, 333 Cedar St, New Haven, CT 06510, USA

Email: editor.ajri@yale.edu; Fax: 203-7854883

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article.

With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen>

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

<https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassette or in electronic databases or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher. A covering letter should clearly identify the person (with address, fax, telephone numbers, and e-mail address) responsible for correspondence. Author(s) must also suggest three possible reviewers and mention any person(s) who may have a conflict of interest if requested to review the paper. If no conflict of interest exists, please explicitly state this in the covering letter. Failure to suggest three reviewers will delay processing.

4. Order the elements comprising the manuscript as follows: title page, abstract, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions, appendix, acknowledgments, references, tables and figure-captions list.

5. Categories of publication: The following types of articles will be considered for publication. Authors are advised that submissions exceeding the length guidelines provided below will be returned unreviewed:

(1) Research Articles: reports of original, basic, clinical, translational studies relating to Reproductive Immunology. The reports should be well documented, novel, and significant. Research articles are published an average of 40 days after their final acceptance. The length restrictions for this category of publication are as follows: Text limit of 5000 words excluding references.

(2) Short Communications: Short, definitive reports of highly significant and timely findings. Priority Reports receive an accelerated review. Papers submitted as Priority Reports should contain Materials and Methods and Results and Discussions sections. The length of the whole manuscript is 2500 words.

(3) Reviews: Articles that review a timely subject important to reproductive immunologist researchers. Reviews must be written as concisely as possible. All Review Articles, whether or invited or not, will be subject to peer review. Text limit of 3000 words.

(4) Public Issues: Brief articles (2000 words or less) on topics of interest to scientist involved in the areas of reproduction and immunology and the general public. These topics include articles on funding projects in Reproductive Immunology from the government, foundations; clinical application or directions of the progress in the field of immunology and reproduction; relations, training in the field, public or science education.

(5) Letters to the Editor and Opinion: The Editors invite the submission of correspondence that presents considered opinions in response to articles published in the journal or meeting presentations. Letters to the Editor will be peer reviewed and, if found to meet the requisite publication criteria the Letter may be sent to the author(s) of the originally published article and possibly to other interested parties for a response to be published in the same issue of the journal as the Letter.

(6) Meeting Reports: Brief reports of the Annual meetings of the Societies for Reproductive Immunology or special symposiums. (2000 words)

6. Title page - This should include the title of the article, authors' names (with degrees) and affiliations, complete mailing addresses, fax and telephone numbers of one author who will review the proofs, and suggested running head. The running head should be less than 45 characters (including spaces) and should indicate either diagnosis or major features of the case.

7. Abstract - This should be page two of the manuscript (2). It should be structured and consist of no more than 150 words, organized into four paragraphs, labeled Problem, Method of Study, Results and Conclusions.

8. Key words - A list of 3-6 key words is to be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript and consist of words or phrases not in the title, as they are used for indexing purposes, both internal and external. They should each be arranged in alphabetical order and separated by a comma (,).

9. Acknowledgments - All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one separate paragraph that directly precedes the reference section. The inclusion of individuals and/or of institutions in the acknowledgment section in a manuscript requires a signed approval from each individual mentioned in the acknowledgment and/or of an authorized individual representing the institution(s) that clearly states that the individual(s) and/or institution(s) agree to be named in an acknowledgment section of the paper. Illustrations from other publications must be acknowledged. Include the following when applicable: author(s), title of journal or book, volume number, page(s), month and year.

10. References - References are identified in the text by superscript figures. All references cited in the text should be typed double-spaced in a separate section at the end of the paper and numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. Once a reference is cited, all subsequent citations should be to the original number. Abbreviations should conform to those in *Index Medicus*. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Journal Article:

1. Glass RH, Ericsson RJ: Intrauterine insemination of isolated motile sperm. *Fertil Steril* 1978;29:535-539.

Book:

2. Leigh H, Reiser MF: *The Patient*. New York, Plenum Medical, 1980.

Contribution to a book:

3. Shapiro BM: Awakening of the invertebrate egg at fertilization. *In* *Fertilization and Embryonic Development in Vitro*, L Mastroianni Jr., JD Biggers (eds). New York, Plenum Press, 1981, pp 233-255.

11. Tables - Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self explanatory and include a brief descriptive title. Tables can be submitted as Excel or MS Word files.

12. Illustrations/Figures - Three sets of unmounted and untrimmed photographs, drawings, diagrams and/or charts are to be submitted, each in a separate labeled envelope. Illustrations should preferably be in the proportion of 12.5 x 18 cm (5 x 7 inch). Write the title of the paper, the name of the first author and set number (Set 1 of 3, etc.) on each of the envelopes.

Each figure is to be numbered in the consecutive series of Arabic numerals in the order in which it is cited in the text. Write the title of your paper, the name of the first author and the figure number on an adhesive label, which should be pasted on the back of each figure. On the label also indicate clearly the top margin of each figure.

Illustrations in full color are accepted for publication if the editors believe that color will add significantly to the published manuscript. Digital artwork for reproduction should preferably be submitted as EPS, TIFF or high-resolution JPEG files and meet our standards, but we may also be able to use other formats so please include these (see http://authorservices.wiley.com/submit_illust.asp)

13. Legends: Legends should be double-spaced, beginning on a separate sheet of paper. They should be numbered with Arabic numerals and referred to in the text. Maximum length should be limited to 100 words.

14. The journal requires that investigations performed in the United States on human subjects have the prior approval of the appropriate institutional committee on human experimentation.

15. Rapid Publication - Concise manuscripts (4 or fewer journal pages) representing studies of outstanding scientific significance may be submitted for Rapid Publication. These manuscripts must be completely documented by reference to the literature and by a thorough description of the experimental procedures. If authors desire Rapid Publication, they must state so explicitly in their covering letter. For more information regarding guidelines for Rapid Publication, please contact the Central Editorial Office.

16. Short Communications - Short Communications are concise manuscripts of two or less journal pages which represent not more than 10 double-spaced manuscript pages inclusive of figures, tables, and references. Authors must state explicitly in the covering letter that the paper is a Short Communication.

17. All measurements must be given in metric units. English units may also be given parenthetically if the measurements were originally done in English units. These guidelines are in accordance with the 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals'.

18. Proofs: The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available.

Checklist:

- One original and two copies of manuscript
- Individual figures labeled and separated into 3 labeled envelopes
- Diskette labeled with the first named author and title of manuscript
- Structured abstract: maximum length 150 words
- Format of the manuscript conforms to those outlined in 'Instructions for Authors'. Pay particular attention to the references.

NEW: Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

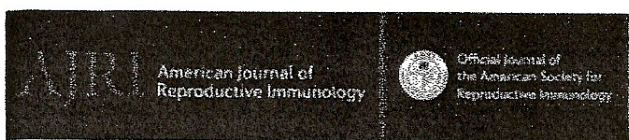
Early View

The American Journal of Reproductive Immunology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Disclaimer

The Publisher, the American Society for Reproductive Immunology and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal; the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher, the American Society for Reproductive Immunology and Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher, the American Society for Reproductive Immunology and Editors of the products advertised.

NEITHER MANUSCRIPTS NOR FIGURES WILL BE RETURNED AFTER REVIEW.

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

ANEXO II

You are logged in as Ana Claudia Campos

Submission
ConfirmationThank you for submitting your manuscript to *American Journal of Reproductive Immunology*.

Manuscript ID: AJRI-03-10-073

Title: Evaluation of cytokines in vaginal secretions of women with bacterial vaginosis associated with human papillomavirus

Authors: Campos, Ana Claudia
Murta, Eddie Fernando
Michelin, Marcia
Reis, Cleomenes

Date Submitted: 23-Mar-2010

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Dear Ms. Campos:

Your manuscript entitled "Evaluation of cytokines in vaginal secretions of women with bacterial vaginosis associated with human papillomavirus" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the American Journal of Reproductive Immunology.

Your manuscript ID is AJRI-03-10-073.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri>.

Please complete the attached Copyright Transfer Agreement and return it to our office at Editorial Manager, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, P.O. Box 208063, LSOG 305, New Haven, CT 06520-8063. Also, kindly fax a signed copy to 203-785-4883. In order to expedite the publication of your manuscript, it is important that you return the original form as soon as possible with all appropriate signatures (via mail). Your manuscript cannot be published without it.

Thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Reproductive Immunology.

Sincerely,
American Journal of Reproductive Immunology Editorial Office

ANEXO III**-QUESTIONÁRIO****Local de coleta:** Hospital Araújo Jorge - ACCG**Pesquisadora:** Ms. Ana Claudia Camargo Campos - CRBM-1463**Doutorado:** Medicina Tropical - Microbiologia - IPTSP/UFG.**Orientador:** Prof. Dr. Cleomenes Reis - IPTSP/UFG**Co-orientador:** Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta - IPON/UFTM**Tese:** Avaliação de micro-organismos e citocinas na secreção endocervical-vaginal de pacientes com vaginose bacteriana.

Data: ____/____/____

Secretaria Municipal de Saúde
Divisão de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente
IPTSP/UFG

Nome : _____ Raça: _____

Data de nascimento : ____/____/____ Estado civil: _____

Nome da mãe: _____

Endereço: _____

Escolaridade: _____ Fone: _____

1- Antecedentes Pessoais:

Menarca: _____ DUM: _____ Ciclos: _____

Sexarca: _____ Nº de Parceiros (nos últimos 05 anos): _____

Frequência das relações sexuais/semana: _____ G: _____ P: _____ A: _____

Método contraceptivo : _____

Doenças prévias/DST: _____

Cirurgias prévias: _____

Tabagismo: _____ Quantos tempo: _____

Medicamentos: _____

Usa duchas vaginais com ou sem anti-sépticos: _____

2- Antecedentes familiares:

Ca de colo do útero: () Sim () Não

Parentesco

: _____

Ca de mama: () Sim () Não Parentesco:

3- Queixas atuais:

Corrimento com odor : () Sim () Não

Ardência Vaginal: () Sim () Não

Prurido vulvar: () Sim () Não

Hiperemia vulvar : () Sim () Não

Fissuras vulvares: () Sim () Não

Dispareunia superficial: () Sim () Não; Profunda: () Sim () Não

Disúria : () Sim () Não

4- Exame Físico:

Estado Geral: _____

ACV: _____ PA: _____ mmHg AR: _____

Mamas: _____

Abdômen: _____

Vulva: _____

Períneo: _____

Especular: _____

Toque: _____

pH vaginal: _____ Teste de amina : () Positivo () Negativo

5-

HD: _____

6-

CONDUTA: _____

RETORNOS

ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa intitulada: Avaliação de micro-organismos e citocinas na secreção endocervical-vaginal de pacientes com vaginose bacteriana. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, que será feita pela pesquisadora do projeto e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não está penalizada de forma alguma. Se aceitar participar e decidir retirar seu consentimento, não será prejudicada em seu tratamento. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável;

Pesquisadora: Ana Claudia Camargo Campos - 30203 2975 / 8151 8424

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Cleomenes Reis - 3209 6108

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, pelo telefone 3243 7050.

Infecções na vagina são problemas comuns em mulheres, principalmente as que têm vida sexual ativa (praticam o sexo), podendo causar coceira, dor e corrimento. Em mulheres com HPV (um tipo de vírus) estes problemas tornam-se muito mais comuns, porém, ainda não se sabe o motivo desta associação. Na mucosa vaginal existem células de defesa que produzem citocinas (proteínas) responsáveis pelo combate ao processo inflamatório devido à micro-organismos causadores de vaginose então estas proteínas fazem parte da defesa local de mucosa.

Esta pesquisa tem como objetivo, avaliar em mulheres com idades de 20 a 40 anos a produção das citocinas no trato genital inferior e os micro-organismos mais frequentes em mulheres com e sem vaginose bacteriana, atendidas nas Unidades Básicas de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia. Identificar os micro-organismos responsáveis pelas vaginoses bacterianas ou demais infecções vaginais em mulheres na fase reprodutiva. Analisar se há associação entre a presença de vaginose bacteriana e a infecção pelo papilomavírus humano no material cérvico-vaginal além da presença de citocinas a fim de relacionar os fatores imunológicos com a evolução das infecções. Analisar os dados fisiológicos de pacientes incluídas como o grau de acidez da vagina, doenças como DST (Doenças Sexualmente Transmissíveis), número de parceiros e relações sexuais, uso de contraceptivos orais, correlacionando-os com a presença destas bactérias, fungos e outros parasitas no ambiente vaginal.

A secreção vaginal (corrimento) e o material para pesquisa de HPV e proteínas serão coletados pelo médico no consultório de ginecologia durante uma consulta de rotina, não sendo necessário que o paciente venha ao hospital exclusivamente para este fim, excluindo qualquer gasto extra. Em momento algum da realização da pesquisa ou da sua publicação, o paciente não terá sua identidade (nome) revelada ou surgirão problemas particulares ou pessoais

para os mesmos. Se necessário, a convocação do paciente para exclusiva colaboração com a pesquisa, o vale transporte será fornecido pelo pesquisador.

Não haverá riscos, prejuízos, lesões ou desconfortos na realização do exame para a pesquisa, pois as condutas utilizadas são de rotina nos consultórios médicos e a paciente se beneficiará com sua participação, pois o resultado da cultura da secreção vaginal será enviado ao seu médico onde será analisado, dando seguimento às devidas necessidades de tratamento. A comunidade receberá retorno com a pesquisa, pois através do estudo do perfil de citocinas em casos infecciosos e inflamatórios na vagina, poder-se-ão obter um melhor entendimento da imunidade das mucosas vaginais e possivelmente a utilização de condutas clínicas subseqüentes como as imunoterapias.

Os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa que tem previsão de término em fevereiro de 2008 e não serão armazenados para estudos futuros. A participação como voluntário nesta pesquisa contribuirá para o estudo da identificação de germes causadores de vaginose bacteriana presentes no ambiente vaginal de pacientes e verificar a concentração de citocinas do trato genital inferior, na tentativa de explicar qual a relação existente entre eles.

Pesquisadora: Ana Claudia Camargo Campos

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, N° de prontuário _____ abaixo assinado concordo em participar do estudo, Avaliação de micro-organismos e citocinas na secreção endocervical-vaginal de pacientes com vaginose bacteriana, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, assim como a ausência de riscos e o benefício que terei decorrente de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve á qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Goiânia, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do paciente ou seu responsável

Assinatura do pesquisador responsável



ANEXO V

Divisão de Saúde da Mulher Criança e Adolescência da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia.

Tese de Doutorado do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP/UFG

Avaliação de micro-organismos e citocinas na secreção endocervical-vaginal de pacientes com vaginose bacteriana.

Material a ser utilizado

1. Jarra de Anaerobiose;
2. Caixa de isopor com gelo;
3. Tubete contendo 1 lâmina de vidro com ponta fosca,
4. Caldo BHI PRAS, uma Placa de Petri com Agar Sangue Humano a 5%, Tubo com salina 0,85%
5. Gotejador contendo KOH a 10% e dois Swabs;
6. Escova ginecológica e um tubo de Eppendorf;
7. Pincel de retroprojeto para identificar o material;
8. Fita para medir o pH vaginal.

Protocolo de coleta:

- Enviar a paciente a uma sala do posto de saúde para a aplicação do questionário e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela doutoranda ou pela funcionária do Laboratório em parceria.
- Em outra sala prosseguir com a coleta do material como a seguir: O tubo contendo caldo BHI PRAS, a Placa de Petri e a lâmina deverão ser identificadas com as iniciais do nome da paciente com pincel de retroprojeto.
- Para a realização do exame, a mulher deve ser colocada na posição ginecológica, a seguir coloca-se o espéculo. Não deve ser usado lubrificante para não interferir na confecção do esfregaço e isolamento de micro-organismos.
- Verificar o aspecto clínico da mucosa vaginal e colocar a fita de pH vaginal fornecida, em contato com as paredes laterais superiores da vagina por 30 segundos, em seguida anotá-los no questionário;
- Introduzir a escova ginecológica na endocérvice, girar duas vezes a 360°, retirar e inserir a escova no tubo de Eppendorf® contendo 0,3 ml de salina, cortar a haste, fechar o tubo completamente e colocá-lo na caixa com gelo - este material será utilizado na pesquisa de HPV (PCR) e dosagem de citocinas (ELISA);
- Coletar o material do fundo de saco (fórnice posterior) com um swab e semear na placa de agar sangue e fazer as estrias com a alça calibrada descartável e em seguida introduzir o swab no caldo BHI PRAS cortando a sua haste e fechando o tubo e colocá-los na jarra de anaerobiose;
- Coletar o material do fundo de saco com um outro swab e confeccionar uma lâmina, que será colocada uma gota de KOH a 10%, observando o odor característico da volatilização de amins característico de VB (cheiro de peixe);
- Em seguida, introduzir este swab no tubo contendo 0,5ml de salina 0,85% esterilizada e tampar o tubo com o tampão de algodão;

OBS: Os procedimentos de coleta serão realizados pela doutoranda e por uma funcionária da coleta de exame citológico do laboratório Médico Papanicolaou.

Doutoranda: Ana Claudia Camargo Campos

Orientador: Prof. Dr. Cleomenes Reis

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

CEP/ACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROTOCOLO CEPACCG Nº 069/06

Goiânia, 12/02/2007.

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):

Orientador: Prof. Dr. Cleomenes Reis

Doutoranda: Prof^a Ms. Ana Cláudia Camargo Campos

TÍTULO: "Avaliação de microrganismos e citocinas no trato genital inferior de mulheres com vaginose bacteriana"

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: ACCG/HAJ - Ginecologia e mama

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, após a análise das adequações solicitadas, **aprovou sem restrições** o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).


Dr. Geraldo Silva Queiroz
Coordenador do CEPACCG