

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

IMPORTANTE

As páginas a seguir são referentes ao Relatório Original do PIBIC intitulado: **“Detecção molecular de *Trichomonas vaginalis* em mulheres com citologia normal”** desenvolvido por mim, bolsista da FAPEAM, Arine Heloíse Jacinto, juntamente com a profa. Dra. Cristina Borborema. No período de submissão do projeto, por falta de atenção, acabei enviando o documento errado para a minha orientadora submeter, pois o mesmo ainda estava sob revisão (Relatório Parcial), por isso na página 2 do mesmo estava escrito: “Relatório Parcial”. A pedido do DAP, como solicitado pela FAPEAM, o Relatório Final do PIBIC devidamente corrigido e em documento no formato WORD segue em anexo.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* EM
MULHERES COM CITOLOGIA NORMAL**

Bolsista: Arine Heloíse Vieira Lopes Jacinto, FAPEAM

**MANAUS
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0199/2013
DETECÇÃO MOLECULAR DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* EM
MULHERES COM CITOLOGIA NORMAL**

Bolsista: Arine Heloíse Vieira Lopes Jacinto, FAPEAM

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos

**MANAUS
2014**

RESUMO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são afecções que têm como característica a transmissão através de práticas sexuais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, na década de 90, ocorreram cerca de 340 milhões de novos casos de DST curáveis em todo o mundo, sendo 10 a 12 milhões destes no Brasil. O *Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado que vive, principalmente, no muco e secreção vaginal das mulheres e é o causador da DST não-viral mais comum no mundo inteiro: a tricomoníase. Em mulheres, pode haver sintomas de severa inflamação e irritação da mucosa genital, com presença de corrimento e focos hemorrágicos, permitindo maior suscetibilidade do portador a outras DST. Outras vezes ainda, a tricomoníase é assintomática sendo, ocasionalmente, descoberta através do exame de rotina. O meio mais comum de detecção do *T. vaginalis* é a visualização dos protozoários móveis em preparações salinas de fluido vaginal. O exame citológico também pode ser utilizado, mas apresenta baixa sensibilidade. Poucos são os dados oficiais sobre a tricomoníase, aliado a isso, a falta de estudos de base populacional dificulta a visibilidade do problema. Sendo assim, este projeto objetivou realizar o diagnóstico molecular do patógeno *T. vaginalis* por meio da PCR *touchdown*, em 164 mulheres com citologia normal atendidas pelo serviço de uma clínica da Rede Básica de Saúde da cidade de Manaus, utilizando o par de primers BTUB2/BTUB9 desenvolvido por MADICO *et al.* (1998), que amplifica uma região conservada do patógeno: a betatubulina. Os resultados negativos para infecção por *Trichomonas* testificaram a viabilidade, bem como a especificidade e eficácia da técnica, uma vez que confirmaram o diagnóstico citológico negativo das 164 mulheres participantes do estudo.

Palavras-Chaves: Diagnóstico Molecular; *Trichomonas vaginalis*; PCR *touchdown*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (5mg/mL), evidenciando um fragmento de 270 pb correspondente à amplificação da região microssatélite GATA do cromossomo 15 humano, utilizando os iniciadores ISO9G (PONTES *et al.*, 2003) 16
- Figura 2** - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (5mg/mL), evidenciando um fragmento de 112pb correspondente à amplificação da região betatubulina do patógeno *T. vaginalis*, utilizando os iniciadores BTUB2/BTUB9 (MADICO *et al.*, 1998) 17

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Sistema para PCR DNA genômico 11
- Quadro 2** - Sistema de Reação para o diagnóstico molecular de *T. vaginalis* 12

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Condições da amplificação controle do DNA 11
- Tabela 2** - Perfil socioeconômico e clínico das participantes do estudo 14
- Tabela 3** - Perfil clínico das mulheres (cont.) 15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Extração do DNA genômico.....	10
4.2 Amplificação controle do DNA genômico.....	10
4.3 Quantificação e Padronização do DNA genômico.....	11
4.4 Detecção Molecular do <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5.1 Caracterização das amostras.....	13
5.2 Procedimentos Moleculares.....	16
6. CONCLUSÕES.....	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
APÊNDICES.....	23
ANEXOS.....	27

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) caracterizam-se por serem infecções causadas por mais de 30 patógenos diferentes entre bactérias, vírus e parasitas sendo transmitidas, principalmente, pelo contato sexual. A maioria dessas doenças não apresenta qualquer tipo de sintomatologia e, quando não diagnosticadas e tratadas a tempo, podem evoluir para complicações graves como infertilidades, abortos espontâneos, infecção congênita e perinatal, câncer ou agir como facilitadoras do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) (SOOD & KAPIL, 2008; WHO, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A tricomoníase é uma DST que pode apresentar ampla variedade de manifestações clínicas, entretanto, os sinais e sintomas dependem das condições individuais, da agressividade e do número de parasitos infectantes. O aparecimento de sintomas de severa inflamação e irritação da mucosa genital, com presença de corrimento, são manifestações clínicas que comumente atingem a maioria das mulheres infectadas. Outras vezes a tricomoníase é assintomática e, ocasionalmente, descoberta em um exame de rotina (PETRIN *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2000).

No Brasil, existem poucos dados oficiais sobre a epidemiologia das DST, já que a maioria delas não são de notificação compulsória. Aliado a isso, a falta de estudos de base populacional dificulta a visibilidade do problema. A maioria dos dados disponíveis provém, portanto, de investigações regionais como o descrito por ROCHA (2012). Diante deste panorama, o presente projeto tem o intuito de realizar o diagnóstico molecular deste patógeno em mulheres atendidas pela Rede Básica de Saúde da cidade de Manaus.

2 OBJETIVOS

Geral

Realizar o diagnóstico molecular do *Trichomonas vaginalis* em um grupo de mulheres com diagnóstico citológico normal/inflamatório.

Específicos

Relacionar os resultados da detecção molecular do *Trichomonas vaginalis* com os dados clínicos e comportamentais e as variáveis sócio-demográficas das mulheres analisadas no estudo.

Relacionar os resultados da detecção molecular do *Trichomonas vaginalis* com os dados do exame citológico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para o ano de 2008 mais de 500 milhões de novos casos por ano para as doenças sexualmente transmissíveis que são curáveis, a saber, gonorréia, clamídia, sífilis e tricomoníase. Esses dados são alarmantes quando se leva em consideração que a década de 90 foi finalizada com um número aproximado de 340 milhões de novos casos de DST curáveis em todo o mundo, sendo que, dentre estes, 10 a 12 milhões foram detectados no Brasil (WHO, 2003; WHO, 2014).

A tricomoníase é a DST não-viral mais comum no mundo inteiro com uma incidência anual superior a 270 milhões de novos casos, considerando apenas pessoas com idade entre 15 e 49 anos. Em 2012, segundo dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), só nos Estados Unidos detectou-se uma incidência de 219 mil mulheres portadoras de tricomoníase. É causada pelo *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado que vive, principalmente, no muco e secreção vaginal das mulheres. Em homens, pode colonizar a uretra, próstata e epidídimo, demonstrando assim alto tropismo pelo epitélio escamoso genital (MADICO *et al.*, 1998; CATES W Jr, 1999; SCHWEBKER & BURGESS, 2004; CDC, 2014).

A tricomoníase apresenta grande variabilidade de manifestações patológicas, desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (vaginite), no entanto é uma doença de idade reprodutiva, já que raramente suas manifestações clínicas são observadas antes da menarca ou após a menopausa. Dentre as mulheres infectadas, em média 25% a 50% são assintomáticas, têm pH (3,8 – 4,2) e flora vaginal normal, sendo que um terço dessas pacientes se torna sintomática seis meses após a infecção (PETRIN, 1998; LEHKER & ALDERETE, 2000; BARRIO, 2002).

O *T. vaginalis* não é grande causador de sequelas e, por isso, muitos clínicos têm considerado a doença mais um incômodo do que um problema de saúde pública (BOWDEN

& GARNETT, 1999). Entretanto, o parasito tem sido destacado como um dos principais patógenos do homem e da mulher, sendo associado a sérias complicações de saúde (KULDA, 1999).

As informações epidemiológicas sobre a prevalência de infecção por *T. vaginalis* são escassas, já que esta não é uma doença de notificação compulsória e, pelo fato de suas sequelas serem pouco graves, como se acreditava até recentemente, não faziam dela alvo de controle e atenção pelos sistemas de saúde (MILLER *et al.*, 2008; SHAFIR, SOVILLO, SMITH, 2009).

O meio mais comum de detecção do *T. vaginalis* é a visualização dos parasitos móveis em preparações salinas de fluido vaginal, que deve ser realizada dentro de 10 a 20 minutos após a coleta da amostra, ou os organismos perdem a motilidade e visibilidade. Embora seja barato e rápido, o método depende muito da experiência do citologista e tem baixa sensibilidade (35 a 80%) principalmente em pacientes assintomáticas, devido ao baixo número de organismos na amostra. O teste de Papanicolaou é outra alternativa a ser utilizada, mas também apresenta baixa sensibilidade. Até hoje o padrão ouro para o diagnóstico do *T. vaginalis* tem sido a cultura em meio líquido (MADICO *et al.*, 1998; SCHWEBKER & BURGESS, 2004; BRAVO *et al.*, 2010; HOLLMAN *et al.*, 2010).

Entretanto, o advento da Biologia Molecular, com base na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) acabou se tornando uma nova alternativa diagnóstica. A PCR *touchdown* é uma variante da PCR convencional desenvolvida para tentar diminuir a formação de produtos amplificados inespecíficos, dessa vez através do aumento da temperatura inicial de anelamento (aumento da estringência). Nesta técnica, o termociclador é programado para diminuir de forma sequencial a temperatura de anelamento dos iniciadores nos ciclos iniciais da PCR até determinada temperatura, a qual supostamente é a ideal, sendo mantida nos ciclos restantes (MADICO *et al.*, 1998; RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006).

O clássico estudo de Madico *et al.* (1998) compara dois métodos diagnósticos diferentes para a detecção deste patógeno em amostras cervicais de 350 mulheres atendidas em uma clínica de DST do exército dos Estados Unidos. Através da cultura em meio líquido, os pesquisadores conseguiram detectar uma prevalência do *T. vaginalis* em 6,6% das amostras, enquanto que através da PCR *touchdown* o parasita foi detectado em 39,0% das amostras, demonstrando assim a alta sensibilidade do método molecular.

No Brasil, o estudo realizado pela pesquisadora Rocha (2012) em mulheres do município de Coari, no Amazonas, teve como finalidade verificar a epidemiologia de algumas DST a nível molecular em mulheres atendidas na Atenção Primária à Saúde, e é um dos poucos estudos encontrados que envolvem o parasito, no que diz respeito à Região Norte do país. Nele, a pesquisadora realizou o diagnóstico molecular do *T. vaginalis* através da técnica de PCR *touchdown* e encontrou uma prevalência de 12,7%, destacando-o como o segundo patógeno mais encontrado nessas mulheres dentre os sete estudados, a saber: Papilomavírus Humano (o mais prevalente, com 29,1% das detecções), seguido pelo *Trichomonas vaginalis*, Herpes Vírus Simples 2, Citomegalovírus Humano, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

Dessa forma, avalia-se que o advento de estudos a nível molecular através da PCR para o diagnóstico do *T. vaginalis* tem se mostrado bastante sensível, variando neste quesito de 81 a 97%, excedendo todos os anteriores, até mesmo a cultura (VAN DER POL, KRAFT, WILLIAMS, 2006; VAN DER POL *et al.*, 2008). No entanto, a epidemiologia do *Trichomonas vaginalis* é extremamente preocupante, uma vez que evidencia alta incidência em escala mundial. Apesar desta doença possuir sintomatologia severa com grande reação inflamatória e que provoca focos hemorrágicos nas mucosas, fato este que expõe o portador a outras DST, ainda se nota certo descaso com relação à observação e ao acompanhamento desses casos pelo sistema de saúde (MADICO *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) e aprovado sob CAAE 15409213.0.0000.5020 e trata-se de um estudo do tipo transversal que tem como alvo a detecção a nível molecular do *Trichomonas vaginalis* em 164 amostras cervicais de mulheres com citológico normal/inflamatório, coletadas no período de março a julho de 2009, na Policlínica Castelo Branco, localizada na zona centro-sul de Manaus e que foram alvos da dissertação “Co-infecção do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com citologia normal e alterada”, desenvolvida pela pesquisadora Évelyn Costa Lira.

As pacientes foram convidadas a participar do estudo obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão conforme descrito no ANEXO 1 e responderam a um questionário padronizado (Apêndice A).

4.1 Extração do DNA genômico

As amostras cervicais foram mantidas a -20°C desde sua coleta e posteriormente descongeladas à temperatura ambiente para a realização da extração do DNA genômico através do kit *AccuPrep®* (Bionner), de acordo com as instruções do fabricante (ANEXO II).

4.2 Amplificação controle do DNA genômico

Para a confirmação da presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado, que serviu de controle da viabilidade do DNA extraído nas amostras para as reações de PCR, foi utilizado um par de *primers* (ISO9G) que amplificam uma região microsatélite (GATA) do cromossoma 15 humano e evidencia uma banda correspondente a aproximadamente 270 pares de base (pb) (PONTES *et al.*, 2003). O sistema de reação, bem como as PCR foram realizadas de acordo com o Quadro 1 e a Tabela 1, respectivamente.

Quadro 1: Sistema para PCR de DNA genômico

Reagentes/Concentração	Volumes
Água Milli-Q	3,45 µL
Tampão da Enzima 10X (500 mM KCl e 100 mM Tris-HCl pH 8,5)	1,9 µL
dNTP 2,5 mM	1,9 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,9 µL
<i>primer</i> ISO9G 1 pmol	3,75 µL
Enzima <i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i> 5U/µL	0,1 µL
DNA	2,0 µL
Volume Final	15 µL

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com 1 µL de brometo de etídeo [5 mg/mL], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultravioleta em transiluminador UVPTM e fotografados em sistema digital.

Tabela 1: Condições da amplificação controle do DNA

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

4.3 Quantificação e Padronização do DNA genômico

A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro pela absorbância (ABS) das bases a 260 nm e 280 nm e padronizadas em concentração de 10-20 ng/µL. As amostras que demonstraram concentração superior foram diluídas em TE, e aquelas que demonstraram concentração inferior foram processadas por meio de um protocolo de concentração por acetato de amônia (ANEXO III).

4.4 Detecção Molecular do *Trichomonas vaginalis*

Para a detecção do *T. vaginalis* foi realizada uma PCR *touchdown* utilizando o par de *primers* BTUB2/BTUB9 desenvolvidos por Madico *et al.* (1998) que anelam em uma região bem conservada do gene beta-tubulina do *T. vaginalis*, evidenciando uma banda equivalente a 112 pb.

O sistema de amplificação do DNA também seguiu conforme descrito pelo autor, apenas com algumas modificações (QUADRO 2), bem como as condições de ciclagem.

Quadro 2: Sistema de Reação para o diagnóstico molecular de *T. vaginalis*

Reagentes/Concentração	Volumes
Água Milli-Q	17,0 µL
Tampão da Enzima 10X (160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-HCl (pH 8.8), e 0.1% Tween-20)	2,5 µL
dNTP 10 mM	0,5 µL
MgCl ₂ 100 mM	0,4 µL
<i>primer forward</i> BTUB9 5 pmol	1,0 µL
<i>primer reverse</i> BTUB2 5 pmol	1,0 µL
Enzima Bioron® <i>Taq</i> DNA Polymerase 5U/µL	0,1 µL
DNA	2,5 µL
Volume Final	25 µL

Para o controle positivo das reações, foi utilizada uma amostra cujo exame citológico apontou a presença de *T. vaginalis*, tendo sido confirmada pelo sequenciamento em sequenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*), conforme metodologia padrão do fabricante. Para o controle negativo das reações, utilizou-se Água-Milli-Q no lugar do DNA.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com 1,5 µL de brometo de etídeo [5 mg/mL], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultravioleta em transiluminador UVPTM e fotografados em sistema digital.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas um total de 164 amostras cervicais de mulheres atendidas pelo serviço de ginecologia da Policlínica Castelo Branco, zona centro-sul de Manaus. Os dados descritos através de tabelas fazem parte da dissertação “Co-infecção do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com citologia normal e alterada” e seu uso foi autorizado pela pesquisadora responsável Évelyn Costa Lira.

5.1 Caracterização das Amostras

Com base nas informações relativas ao perfil socioeconômico das 164 mulheres participantes deste estudo (TABELA 2), verificou-se que a média de idade entre elas foi de 36 anos, com DP \pm 12,7 anos. Além disso, houve uma concentração de 55,49% (91/164) de mulheres na faixa etária de 21-40 anos, enquanto que a idade mínima correspondeu à 17 anos e a idade máxima à 75 anos. Diversos estudos apontam a prevalência do *T. vaginalis* em mulheres mais velhas (acima de 30 anos), diferentemente de outros patógenos, como a *C. trachomatis* e a *N. gonorrhoeae*, que acometem mais adolescentes e jovens adultas (SUTTON *et al.*, 2007).

Quanto ao estado civil, 55,48% (91/164) das mulheres são casadas ou possuem união estável. Alguns estudiosos verificaram que o baixo índice da tricomoníase em mulheres casadas deve-se possivelmente ao fato de elas usarem contraceptivos com propriedades tricomonocidas (HOGNIBERG *et al.*, 1994).

Com relação ao nível de escolaridade e à renda familiar, um percentual relativo a 49,39% (81/164) das mulheres chegou a concluir o ensino médio enquanto que 44,51% (73/164) recebem até 1 salário mínimo por mês. Estes são fatores de avaliação extremamente importantes, porque a falta de informação e de acesso à prevenção, bem como ao seu tratamento adequado, facilita a inadimplência quanto aos cuidados destas mulheres com sua saúde.

Tabela 2: Perfil socioeconômico e clínico das participantes do estudo

Variáveis	f	f (%)	Média DP ±	Amplitude
<i>Faixa Etária</i>				
16 -20 anos	15	9,15%	36 ± 12,7	17 - 75 anos
21 -30 anos	47	28,66%		
31 -40 anos	44	26,83%		
41 -50 anos	31	18,90%		
51 -65 anos	23	14,02%		
Acima de 65 anos	4	2,44%		
<i>Estado Civil</i>				
Solteira	53	32,32%		
União estável	26	15,85%		
Casada	65	39,63%		
Divorciada/Separada	15	9,15%		
Viúva	5	3,05%		
<i>Escolaridade*</i>				
Ensino Fundamental Incompleto	35	21,34%		
Ensino Médio Incompleto	22	13,41%		
Ensino Médio Completo	81	49,39%		
Ensino Superior	24	14,63%		
NR	2	1,22%		
<i>Renda Familiar*</i>				
Até 1 salário mínimo	73	44,51%		
De 2 a 3 salários mínimos	52	31,71%		
De 3 a 4 salários mínimos	24	14,63%		
De 5 a 6 salários mínimos	9	5,49%		
Acima de 6 salários mínimos	5	3,05%		
NR	1	0,61%		
<i>Uso de anticoncepcional</i>				
Não	78	47,56%		
Sim	82	50,00 %		
NR	4	2,44%		
<i>Hábito de fumar</i>				
Não	103	62,80%		
Sim	25	15,24%		
Fumou no passado	34	20,73%		
NR	2	1,22%		
<i>Número de parceiros sexuais</i>				
Um	27	16,46%		
Dois	33	20,12%		
Três	20	12,20%		
Quatro	14	8,54%		
Cinco ou mais	67	40,85%		
NR	3	1,83%		
<i>HIV</i>				
Negativo	65	39,63%		
Positivo	2	1,22%		
Nunca fez	91	55,49%		
NR	6	3,66%		

f: Frequência; f (%): Frequência Relativa
NR: Não Responderam

Dados contidos na Tabela 2 demonstram ainda que 50% (82/164) dessas mulheres fazia uso de algum tipo de anticoncepcional, 62,80% (103/164) não eram tabagistas, 40,85% (67/164) já se envolveram com cinco ou mais parceiros sexuais e 39,63% (65/164) tiveram resultado negativo para infecção por HIV, no entanto, 55,49% (91/164) nunca sequer fizeram este exame. É importante frisar que 1,22% (2/164) das mulheres relataram que já haviam tido resultado positivo em teste para o HIV.

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que a idade média da primeira relação sexual foi de 17 anos (DP \pm 3,67 anos) e que, na primeira gestação foi de, aproximadamente, 21 anos (DP \pm 5,28 anos). No que diz respeito ao número de partos, verifica-se a média de 1 parto normal (DP \pm 1,95 partos), de um máximo de 9 partos normais encontrado entre as participantes.

Tabela 3: Perfil clínico das participantes do estudo (cont.)

Variáveis	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Idade da 1ª relação sexual	17.24	16.00	3.67	10.00	35.00
Idade da 1ª gestação	20.96	19.00	5.28	13.00	43.00
Nº total de abortos	0.60	0.00	0.90	0.00	4.00
Nº de partos normais	1.32	0.00	1.95	0.00	9.00
Nº de partos cesáreos	0,75	0.00	1.04	0.00	7.00

A tricomoníase possui como principais fatores de risco: o grande número de parceiros sexuais, a iniciação sexual precoce, o baixo nível de escolaridade, a pobreza e o uso de ducha vaginal. De certo, a promiscuidade sexual e a falta do uso de métodos contraceptivos durante a relação sexual podem facilitar a infecção pelo *T. vaginalis*, sem falar que o risco de transmissão de HIV torna-se aumentado na presença de doença não-ulcerativa, como a tricomoníase (KHARSANY *et al.*, 1993).

5.2 Procedimentos Moleculares

No total, 164 amostras cervicais foram submetidas à PCR de controle do DNA genômico, possibilitando a amplificação do fragmento de, aproximadamente, 270 pb correspondente à região microssatélite (GATA) do cromossomo 15 humano, fato este que confirmou a viabilidade da extração das amostras e a integridade do DNA para a continuidade do estudo (FIGURA 1).

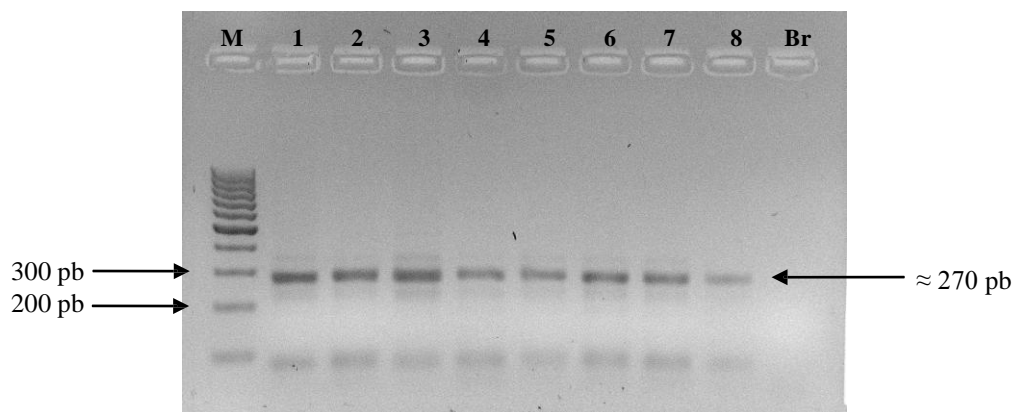


Figura 1: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (5mg/mL), evidenciando um fragmento de 270 pb correspondente à amplificação da região microssatélite GATA do cromossomo 15 humano, utilizando os iniciadores ISO9G (PONTES *et al.*, 2003). M: marcador de peso molecular 100 pb *Fermentas*; Amostras 1 - 8; Br: Branco.

Após a quantificação em espectrofotômetro *Eppendorf*® e sua padronização em concentração de 10-20 ng/μL, as amostras cervicais foram submetidas ao diagnóstico molecular através da PCR *touchdown*, na qual se utilizou os iniciadores BTUB2/BTUB9 que evidenciaram um fragmento de 112 pb (FIGURA 2).

As 164 amostras analisadas neste estudo apresentaram resultado negativo para a presença do DNA de *T. vaginalis*. Resultado este que corresponde ao obtido nos respectivos exames citopatológicos realizado pelas pacientes, que não apontaram a presença de tricomoníase, confirmando assim a eficácia do teste diagnóstico utilizado neste estudo.

Os métodos diagnósticos normalmente empregados para detecção de tricomoníase, tanto nos estudos quanto na prática clínica são a cultura, a citologia e o exame a fresco, sendo

a cultura ainda considerada o padrão-ouro. Entretanto, a PCR acaba se tornando uma nova alternativa diagnóstica para a doença, por sua sensibilidade, rapidez e eficácia (MACIEL *et al.*, 2004; ROCHA, 2012).

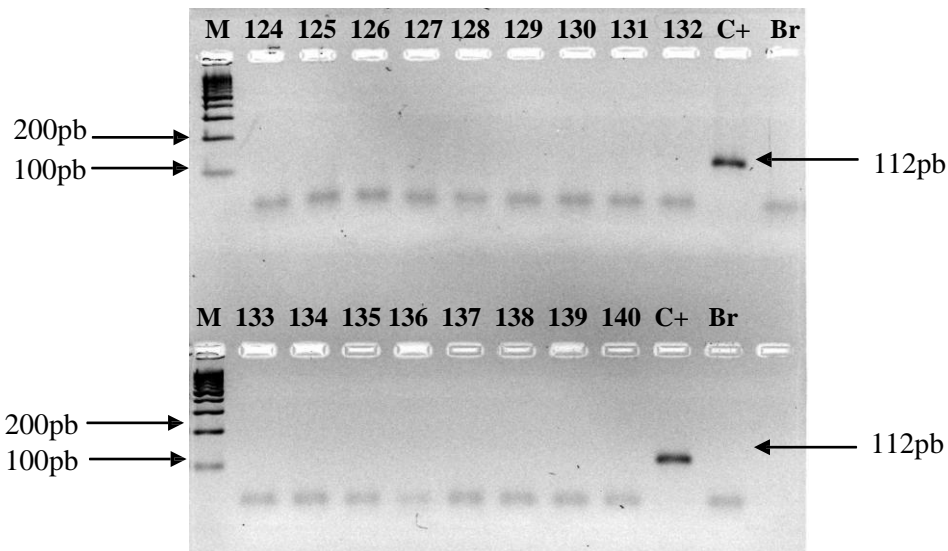


Figura 2: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (5 mg/mL), evidenciando um fragmento de 112pb correspondente à amplificação da região betatubulina do patógeno *T. vaginalis*, utilizando os iniciadores BTUB2/BTUB9 (MADICO *et al.*, 1998). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Fermentas*; Amostras: 124-140; C+: Controle positivo; Br: Branco.

O estudo de Madico *et al.* (1998) comparou dois métodos diagnósticos diferentes para a detecção do *T. vaginalis* em 350 amostras cervicais de mulheres atendidas em uma clínica de DST do exército dos Estados Unidos. Os resultados da cultura em meio líquido detectaram uma prevalência 6,6% do *T. vaginalis* nas amostras, enquanto que através da PCR o protozoário foi detectado em 39,0% das amostras, revelando uma alta incidência do patógeno. Já a pesquisadora Rocha (2012) verificou a prevalência de algumas DST por meio da PCR em amostras cervicais de mulheres que procuraram o serviço de ginecologia no município de Coari, Amazonas. Seus resultados revelaram uma prevalência de 12,7% do *T. vaginalis*, o segundo patógeno mais prevalente.

Estudos com alta incidência de tricomoníase como os de Madico *et al.* (1998) e Rocha (2012) demonstram que fatores como hábitos higiênicos inadequados e promiscuidade sexual estão diretamente relacionados à suscetibilidade de infecção pelo *T. vaginalis*. Além disso, mulheres que residem no interior das grandes capitais muitas vezes não têm acesso à informação e ao tratamento adequado devido à falta de profissionais de saúde. Este estudo foi realizado em uma clínica de atendimento às mulheres de classe média, o que torna possível relacionar os diagnósticos negativos ao nível de escolaridade e acesso à informação além do atendimento diferenciado que conta com uma equipe médica especializada e mais bem equipada em comparação aos serviços fornecido nos municípios de Manaus.

LUPPI *et al.* (2011) realizaram um estudo sobre a prevalência de DST em mulheres atendidas por um serviço de saúde, em São Paulo. Um dos patógenos investigados foi o *T. vaginalis*, utilizando a PCR em amostras cervicais. Das 781 mulheres investigadas, apenas 3,2% apontaram a presença do *T. vaginalis*. Da mesma maneira, JALAL *et al.* (2013) investigaram a prevalência a nível molecular de patógenos causadores de DST em 1.718 pacientes que frequentavam uma clínica de medicina geniturinária, no Reino Unido. Os resultados revelaram que apenas 4 (0,2%) pacientes apresentaram positividade para *T. vaginalis*, sendo 3 casos em mulheres, demonstrando valores significativos de detecção do parasito, assim como este estudo.

Estudos epidemiológicos relativos à prevalência de DST em Manaus são escassos e refletem a situação encontrada no restante do Brasil, principalmente no que diz respeito à prevalência de infecção pelo *T. vaginalis*, o que pode ser justificado pelo fato de esta não ser uma doença de notificação compulsória. Além disso, é assintomática ou não deixa sequelas graves. O que de fato tem despertado olhares para a importância deste patógeno é sua relação com a infecção pelo HIV (MACIEL, TASCIA, DE CARLI, 2004; MILLER *et al.*, 2008; SHAFIR, SOVILLO, SMITH, 2009; ROCHA, 2012).

6 CONCLUSÕES

1. O resultado do diagnóstico molecular negativo em todas as amostras analisadas para o patógeno *T.vaginalis* coincidiu com o resultado negativo do exame citológico das mulheres participantes do projeto.

2. Por conta dos diagnósticos negativos, não foi possível realizar análises estatísticas correlacionando o diagnóstico molecular das pacientes com suas informações socioeconômicas e clínicas.

3. Contudo, mesmo não tendo obtido resultados positivos para tricomoníase nos testes moleculares, este ainda constitui um ponto crucial para nosso projeto, uma vez que tais resultados se mostraram coerentes com os obtidos pelo diagnóstico citológico, confirmando assim a eficácia e a alta especificidade, bem como a rapidez do teste no diagnóstico da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRIO, A. G.; RUIZ, J. N.; PEREIRA, D. M.; GALLEGO, E. R.; FERNÁNDEZ, E. R.; ESCARIO, J. A. **Biological Variability in clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis***. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.97, p.893-896, 2002.
- BRAVO, R. S.; GIRALDO, P. C.; CARVALHO, N. S.; GABIATTI, J. R. E.; VAL, I. C.C.; GIRALDO, H. P. D.; PASSOS, M. D. L. **Tricomoniase vaginal: o que se passa? DST - J bras Doenças Sex Transm**, v.22, n.2, p.73-80, 2010.
- BOWDEN, F. J.; GARNETT, G. P. **Why is *Trichomonas vaginalis* ignored? Sexually Transmitted Infections**, v.75, p.372-374, 1999.
- CATES W Jr.; American Social Health Association Panel. **Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States**. Sex Transm Dis.;26 (4Suppl): S2–S7, 1999.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention - **2012 Sexually Transmitted Diseases Surveillance**. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/std/stats12/default.htm>>. Acesso em: 07 fev 2014.
- HOLLMAN, D.; COUPEY, S. M.; FOX, A. S.; HEROLD, B. C. **Screening for *Trichomonas vaginalis* in high-risk adolescent females with a new transcription-mediated nucleic acid amplification test (NATT): associations with ethnicity, symptoms, and prior and current STIs**. Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, v.23, p.312- 316, 2010.
- HOGNIBERG, B. M.; BURGESS, E. ***Trichomonas* of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis***. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2. Ed. San Diego: Academic Press, v.9, p.1-57, 1994.
- KHARSANY A. B.; HOUSEN A. A.; MOODLEY J.; BAGARATEE J.; GOUWS E. **The association between sexually transmitted pathogens and cervical intraepithelial neoplasia in a developing community**. Genitourin Med, n. 69 p.357-360, 1993.
- KULDA, J. **Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance**. International Journal for Parasitology, v.29, p.199-212, 1999.
- JALAL, H.; DELANEY, A.; BENTLEY, N.; SONNEX, C.; CARNE, C. A. **Molecular epidemiology of selected sexually transmitted infections**. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics, v.4, n.3, p. 167-174, 2013.
- LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. **Biology of trichomonosis**. Current Opinion In Infectious Diseases. v.13, p.37-45, 2000.
- LÓPEZ, L. B.; BRAGA, M. B.; LÓPEZ, G. O.; ARROYO, R.; COSTA E SILVA FILHO, F. **Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.72, p. 173-186, 2000.
- LUPPI, C.G.; OLIVEIRA, R.L.S.; VERAS, M.A.; LIPPMAN, S. A.; JONES, H.; DE JESUS, C. H.; PINHO, A. A.; RIBEIRO, M. C.; CAIAFFA-FILHO, H. **Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária**. Rev Bras Epidemiol, v.14, n.3, p.467-477, 2011.

- MACIEL, G.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. **Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis***. J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.40, n.3, p.152-60, Rio de Janeiro, 2004.
- MADICO, G.; QUINN, T. C.; ROMPALO, A.; MCKEE JR, K.T.; GAYDOS, C. A. **Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples**. Journal of Clinical Microbiology, v.36, n.11, p.3205-3210, 1998.
- MILLER, M.; LIAO, Y.; GOMEZ, A. M.; GAYDOS, C. A.; D'MELLOW, D. **Factors Associated with the Prevalence and Incidence of *Trichomonas vaginalis* Infection among African American Women in New York City Who Use Drugs**. The Journal of Infectious Diseases, v.197, p.503-509, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **BRASIL. DST e AIDS**. Elaborado por: Núcleo de Estudos em Saúde do Adolescente – NESA/UERJ. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-sao-dst>>. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. Acesso em 28 jan 2014.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. **Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis***. Clinical Microbiology Reviews., v.11, p.300-317, 1998.
- PONTES, I.M.; ÂNGELO, P.C.S.; ASTOLFI FILHO, S. **Desenvolvimento de Novos Marcadores Microssatélites para Análise Genética em Humanos. A Amazônia na Era Genômica e Pós-Genômica**. In: 4º Encontro de Genética do Amazonas e 1º Encontro de Genética da Região Norte, 2003, Manaus. **Livro de Resumos**. Manaus: Sociedade Brasileira de Genética – Regional Amazonas, 2003. p.79.
- ROCHA, D. A. P. **Epidemiologia Molecular de Patógenos Sexualmente Transmissíveis em Mulheres no Município de Coari, Amazonas**. Manaus: UFAM, 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, 2012).
- RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. **Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao diagnóstico**. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças infecciosas – Diagnóstico Molecular** - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.16-40, 2006.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ª Edição. New York: Cold Spring Harbor Lab. USA, 1989.
- SCHWEBKER, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p.794-803, 2004.
- SHAFIR, S.C.; SORVILLO, F.J.; SMITH, L. **Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans**. Clinical Microbiology Reviews, v. 22, n.1, p.37-45, 2009.
- SOOD S., KAPIL A. **An update on *Trichomonas vaginalis***. Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS, v.29, p.7-14, 2008.
- SUTTON, M.; STENBERG, M.; KOUMANS, E.H.; McQUILLAN, G.; BERMAN, S.; MARKOWITZ, L. **The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004**. CID, v.45, p.1319-1326, 2007.

VAN DER POL, B.; KRAFT, C. S.; WILLIAMS, J. A. **Use of na adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of *Chlamydia* and gonorrhea to detect *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens.** Journal of Clinical Microbiology, v.44, n.2, p.366-373, 2006.

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B. RINALDI, A.; SALATA, R. A; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. ***Trichomonas vaginalis* infections and human immunodeficiency virus acquisition in African women.**The Journal of Infectious Diseases, v.197, p.548-554, 2008.

World Health Organization. **Guidelines for the management of sexually transmitted infection.** Geneva: Switzerland; 2003.

WHO. World Health Organization. **Sexually Infectious Disease.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/index.html>>. Acesso em: 05 fev 2014.

ZHANG, Z. F.; BEGG, C. B. **Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies.** International Journal of Epidemiology, v.23, p. 682-90, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Questionário

QUESTIONÁRIO

I. TRIAGEM

1. Informações sobre o estudo e confiabilidade do estudo

2. Consentimento da paciente em participar do estudo

2.1 Sim

2.2 Não

3. Identificação com as iniciais da paciente _____

4. Data de nascimento ____/____/____

5. Última menstruação ____/____/____

5.1 não sabe informar

5.2 menopausada

6. Qual a sua procedência? Nasceu:

Mora:

6.1 Manaus

6.2 Interior do estado do Amazonas

6.2 Outro estado da região norte

6.3 Outro estado da federação

7. Resultado do exame colpocitológico:

Data do exame: ____/____/____

7.1 NIC I

7.7 Normal

7.2 NIC II

7.8 Inflamatório*

7.3 NIC III/Ca “in situ”

7.4 Carcinoma microinvasor

7.5 Carcinoma escamoso invasor

7.6 Adenocarcinoma

*Inflamatório: Específico

Inespecífico

Candida sp

T. vaginalis

Vaginose bacteriana

Herpes

Chlamydia trachomatis

Cocos

Outros: _____

8. Resultado de biópsia/exame histopatológico:

- 8.1 () NIC I
- 8.2 () NIC II
- 8.3 () NIC III/Ca “in situ”
- 8.4 () Carcinoma microinvasor
- 8.5 () Carcinoma escamoso invasor
- 8.6 () Adenocarcinoma

- 8.7 () Normal

II. QUESTIONÁRIO

9. Qual seu estado civil?

- 9.1 () Solteira
- 9.1 () União estável
- 9.2 () Casada
- 9.3 () Divorciada/separada
- 9.4 () Viúva

10. Qual o nível mais elevado de escolaridade que você completou?

- 10.1 () Primeiro grau incompleto
- 10.2 () Primeiro grau completo
- 10.3 () Segundo grau incompleto
- 10.4 () Segundo grau completo
- 10.5 () Curso profissionalizante após o segundo grau
- 10.6 () Universidade

11. Qual a sua renda familiar?

- 11.1 () 1 salário mínimo
- 11.2 () 2-3 salários mínimos
- 11.3 () 3-4 salários mínimos
- 11.4 () 5-6 salários mínimos
- 11.5 () acima de 6 salários mínimos

12. Idade da 1ª relação sexual _____

13. Idade da 1ª gestação _____

14. Você está grávida no momento?

- 14.1 () Sim
- 14.2 () Não
- 14.3 () Não sabe informar

15. Nº total de abortos _____

16. Nº de partos normais _____

17. Nº de partos cesáreos _____

18. Nº total de partos _____

19. Você utilizou anticoncepcional oral ou injetável nos últimos 10 anos?

19.1 sim

19.2 não

20. Qual das seguintes situações melhor descrevem o seu hábito de fumar?

20.1 Eu nunca fumei

20.2 Eu fumei no passado, mas não fumo atualmente

20.3 Eu geralmente fumo menos de uma carteira por dia

20.4 Eu geralmente fumo em torno de uma carteira ou mais por dia

21. Qual o número de parceiros sexuais que você já teve na vida?

21.1 um

21.2 dois

21.3 três

21.4 quatro

21.5 cinco ou mais

22. Pesquisa para HIV:

22.1 nunca fez exame

22.2 negativo

22.3 positivo

1. OBSERVAÇÕES:

2. RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO:

2. RESULTADO DA PCR:

ANEXOS

ANEXO I

Critérios de Inclusão e Exclusão para as Mulheres Participantes do Projeto

1. Critérios de Inclusão:

- Mulheres residentes no Estado do Amazonas há, pelo menos, dois anos;
- Mulheres com diagnóstico citológico sem alterações malignas, incluindo esfregaços citológicos normais e inflamatórios.

2. Critérios de Exclusão:

- Mulheres que já fizeram conização ou histerectomia total;
- Mulheres indígenas;
- Mulheres que estiverem fazendo uso de antibióticos;
- Mulheres que já estiverem em tratamento de DST ou qualquer outra patologia do trato genital feminino nos últimos três meses.

ANEXO II

Extração de DNA Kit *AccuPrep*®

1. Primeiramente, adicionou-se 20 μL de **Proteinase K** em um microtubo de 1,5 mL novo;

2. Em seguida, foram adicionados 200 μL de amostra cervical ao microtubo contendo a **Proteinase K**;

Obs.: Se houvesse menos de 200 μL de amostra, o volume deveria ser completado com **PBS**.

3. Acrescentou-se 200 μL de **Binding Buffer (GC)** à amostra, que foi imediatamente levada ao vortex;

Obs.: Para uma maior eficiência, era necessário que houvesse completa ressuspensão.

4. Incubou-se o tubo a 60 °C durante 10 min;

5. Depois, adicionou-se 100 μL de **Isopropanol Absoluto**, homogeneizando bem com a pipeta;

Obs.: Após esse passo, deu-se um breve spin.

6. Logo, a ressuspensão foi transferida cuidadosamente para um **Binding Column Tube (2 mL)** sem molhar as bordas;

7. Então, o microtubo foi fechado e centrifugado a 8.000 rpm durante 1 min.;

8. Em seguida, transferiu-se a coluna para um novo microtubo de 2 mL para a filtração;

9. Adicionou-se, assim, 500 μL de **Washing Buffer 1 (W1)**, com muito cuidado para que não molhasse a borda do microtubo. Fechou-se o microtubo, centrifugando-o em seguida a 8.000 rpm durante 1 min.;

10. Feito isto, a solução do microtubo foi descartada;

11. Depois, adicionou-se 500 μL de **Washing Buffer 2 (W2)**, com cuidado para que não molhasse a borda do microtubo. Fechou-se o microtubo, centrifugando-o em seguida a 8.000 rpm durante 1min.;

12. Então, centrifugou-se mais uma vez o tubo a 12.000 rpm durante 1 min para que houvesse total remoção do **Etanol** contido no **Washing Buffer**, checando para que não tivesse qualquer resíduo deste;

13. Posteriormente, transferiu-se a **Binding Column Tube** para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 200 µL de **Elution Buffer/H₂O** para eluição da amostra durante 1 a 5 min à temperatura ambiente;

14. E, finalmente, a amostra foi centrifugada a 8.000 rpm durante 1 min. para completar o processo de eluição;

Nota: O DNA poderia ser usado diretamente ou estocado a 4°C para análises posteriores. Para um período maior de armazenamento, é sugerido eluir com Elution Buffer ao invés de H₂O e estocar a -20° C.

Obs.: O Isopropanol e o PBS não acompanham o kit e ficam estocados separadamente.

ANEXO III**PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO POR ACETATO DE AMÔNIA****Concentração de amostras**

- 1- Primeiramente, adicionou-se 0,1 V de acetato de amônia 7,5 M às amostras a serem concentradas.
- 2- Depois, adicionou-se 2,5 V de álcool absoluto.
- 3- Homogeneizaram-se bem as misturas dentro de cada microtubo, dando leves “batidas” em suas paredes.
- 4- Com isso, as amostras foram deixadas sobre refrigeração a -20°C, durante 60 minutos.
- 5- Passado esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 40 minutos.
- 6- Então, com muito cuidado, o álcool contido em cada microtubo foi eliminado por inversão.
- 7- Em seguida, adicionou-se 100µL de cada álcool a 70% aos tubos.
- 8- Daí então, os tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos.
- 9- Posteriormente, inverteram-se os microtubos para eliminação de todo o álcool e, depois, os tubos foram submetidos à secagem em fluxo laminar por 15 minutos - outra alternativa é utilizar speed a vácuo.
- 10- Feito isto, cada tubo foi ressuspendido em 20 µL de água milli-Q;
- 11- Por fim, cada amostra foi aplicada em gel de agarose para posterior verificação da amplificação do material por eletroforese.