



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

DETECÇÃO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS PRÉ-MALIGNAS E
MALIGNAS ATENDIDAS NA FCECON-AM.

BOLSISTA: MAYARA RACHEL SILVA VILELA - VOLUNTÁRIA

MANAUS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB ñ S /0050/2008

DETECÇÃO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS PRÉ-MALIGNAS E
MALIGNAS ATENDIDAS NA FCECON-AM.

BOLSISTA: MAYARA RACHEL SILVA VILELA - VOLUNTARIA
ORIENTADORA: PROF^a. MSc. JÚNIA RAQUEL DUTRA FERREIRA
COLABORADORA: PROF^a. DR^a. CRISTINA MARIA BORBOREMA
DOS SANTOS

MANAUS

2009

RESUMO

A *Chlamydia trachomatis* (CT) é responsável por uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais frequentes e estima-se que ocorram cerca de 90 milhões de casos por ano em todo o mundo. Relacionada a diversas patologias como as do trato urogenital, tracoma, linfogranuloma venéreo (LGV) e infecções genitais, a CT é apontada como um importante cofator do Papilomavírus humano (HPV) no desenvolvimento de carcinoma cervical. Este vírus encontra-se em 99,7% dos casos de neoplasia de colo de útero. Através de diversos mecanismos, como a modulação da resposta imune, a CT potencializa a ação do HPV em mulheres HPV-positivas, alterando o epitélio cervical normal. Associada ao HPV, a *Chlamydia trachomatis* também aumenta a expressão da proteína oncogênica viral E7 do vírus, a expressão de Ki67, considerado um marcador de proliferação celular presente no núcleo das células, aumento da expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do fator de crescimento transformante α (TGF- α), potencializando os mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical. Com o intuito de detectar a *Chlamydia trachomatis* em 153 amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON-AM), relacionando-se com a detecção e frequência de HPV, o tipo de lesão e faixa etária das pacientes, foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que possui maior sensibilidade e especificidade frente a outros métodos de imunodeteção. A faixa etária das pacientes estudadas foi de 17 a 73 anos, com 38% (n=58) das mulheres entre os 27 aos 36 anos. Das 153 amostras analisadas, 26,8% (n=41) têm presença de CT. Das 153 amostras de pacientes com lesões pré-malignas ou malignas, 149 eram HPV positivas (97%) e, dentre estas, 27,5% (n=41) foram positivas para CT. As amostras HPV-negativas também foram CT-negativas. O tipo de lesão predominante nas pacientes estudadas com co-infecção CT e HPV foi Neoplasia Intra-epitelial Cervical III, presente em 59% (n=24) das mulheres. A frequência de CT relatada nesse estudo encontra-se próxima às de alguns estudos literatura. Provavelmente pela sua modulação na imunidade do hospedeiro e inflamações crônicas, a CT é sugerida como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo de útero, além da infecção por CT ser um fator predisponente para infecção do HPV ou vice-versa. Estas informações são de suma importância para a saúde pública, pois auxiliam na qualificação de programas de controle e prevenção de DSTs.

Palavras - chaves: *Chlamydia trachomatis*, HPV, PCR.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis (CT) is responsible for sexually transmitted diseases (STDs) and these bacteria are more frequent and it is estimated to occur about 90 million cases per year worldwide. Related to various diseases as the urogenital tract, trachoma, lymphogranuloma venereum (LGV) and genital infections, the CT is indicated as an important cofactor of human papillomavirus (HPV) in the development of cervical carcinoma. This virus is found in 99.7% of uterine cervix cancer cases. Through various mechanisms such as modulation of immune response, the CT potentiates the action of HPV in HPV-positive women, altering the normal cervical epithelium. Associated with HPV, *Chlamydia trachomatis* also increases the expression of the viral oncogenic protein E7 virus, the expression of Ki67, considered a marker of cell proliferation in the nucleus of cells, increased expression of the receptor for epidermal growth factor (EGFR) and transforming growth factor β (TGF- β), strengthening the mechanisms involved in cervical carcinogenesis. In order to detect *Chlamydia trachomatis* in 153 patients samples with pre-malignant or malignant cervical lesions at Fundação Centro e Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON-AM), relating to the detection and frequency of HPV, the type of injury and age of the patients, we used the Polymerase chain reaction (PCR) technique, which has higher sensitivity and specificity as compared to other immunodetection methods. The patients age was 17 to 73 years, with 38% (n = 58) women between 27 to 36 years. Of the 153 samples analyzed, the presence of CT was found in 26,8% (n = 41). Of the 153 samples from patients with pre-malignant lesions or malignant, 149 were HPV positive (97%), and among these, 27,5% (n = 41) were positive for CT. The samples HPV-negative were CT-negative. The predominant lesion type in patients with CT and HPV coinfection was Cervical Intraepithelial Neoplasia III, in 59% (n = 24) women. Probably because their modulation of host immunity in chronic inflammation, CT is suggested as a risk factor for the development of uterine cervix cancer, besides being considered a predisposing factor for HPV infection or vice versa. This information is of great importance for public health because it helps in the qualification programs for control and prevention of STDs.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, HPV, PCR.

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
água Milli-Q	água ultra purificada
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	trifosfato adenosina
CAM	Centro de Apoio Multidisciplinar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DIP	doença inflamatória pélvica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
DST	doença sexualmente transmissível
E7	Região Precoce do Genoma Viral
EB	corpos elementares
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EGFR	expressão de receptor de fator de crescimento epidérmico
EIA	Enzimoimunoensaio
FCECON-AM	Fundação Centro e Controle de Oncologia do Amazonas

h	horas
HCl	ácido clorídrico
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau
HSV	<i>herpes simplex vírus</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
ISO3G	Oligonucleotídeo que amplifica um fragmento de 265pb
KL1/KL2	Oligonucleotídeo que amplificam um fragmento de 241pb
LCR	Reação em Cadeia de Ligase
LPS	lipossacarídeo
LSIL	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau
LVG	linfogranuloma venéreo
M	molar
mg	miligrama
MgSO	sulfato de magnésio
mL	mililitros
mM	milimolar
MgCl	cloreto de magnésio
MHC	moléculas de histocompatibilidade
MIF	microimunofluorescência indireta
MOMP	proteína principal da membrana externa

NaCl	cloreto de sódio
NIC I-II-III	neoplasia intra-epitelial cervical (Graus I, II, III)
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	potencial hidrogenionico
PPP	Programa de Primeiros Projetos
PSF	Programa de Saúde da Família
RB	corpos reticulares
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	rotação por minuto
TE	solução tampão
TEB	Tris borato e EDTA
TGF- β	fator de crescimento transformante β
TPK	tampão proteolítico
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	ultravioleta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotografia digital tirada com microscopia óptica. Células infectadas com <i>Chlamydia trachomatis</i> em 24 horas após a infecção.....	15
Figura 2: Sorotipos da <i>Chlamydia trachomatis</i> e as doenças humanas.....	17
Figura 3: Células após 48 horas de infecção pela sorovariante L1 de CT.....	18
Figura 4: Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	20
Tabela 1: Taxas de prevalência da infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i> em mulheres brasileiras relatadas na literatura.....	23
Figura 5: Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular ã CAM ã UFAM.....	32
Figura 6: Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio dos produtos amplificados por PCR para diagnostico molecular de DNA genômico, utilizando o iniciador ISO 3G que amplifica um fragmento de 265 pb.....	39
Gráfico 1: Distribuição das mulheres em estudo quanto à faixa etária.....	40
Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, dos produtos amplificados por PCR para diagnostico molecular de <i>Chlamydia trachomatis</i> , utilizando os iniciadores KL1 e KL2, que amplificam um fragmento de 241 pb.....	40
Gráfico 2: Distribuição da população em estudo quanto à infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> e lesões pré-malignas ou malignas.....	41
Gráfico 3. Distribuição da faixa etária das pacientes com infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> e lesões pré-malignas ou malignas.....	41

Gráfico 4: Coinfecção HPV e *Chlamydia trachomatis* em 149 amostras HPV-positivas.....42

Gráfico 5: Distribuição do grau de lesão cervical nas pacientes com coinfecção *Chlamydia trachomatis* e HPV.....43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	<i>Chlamydia trachomatis</i>	15
2.2	Ciclo de desenvolvimento na célula hospedeira.....	17
2.3	Epidemiologia.....	22
2.4	<i>Chlamydia trachomatis</i> como cofator para o câncer cervical.....	24
2.5	Métodos de detecção para <i>Chlamydia trachomatis</i>	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Geral.....	29
3.2	Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Modelo de Estudo.....	30
4.2	Amostras.....	30
4.3	Critérios de Elegibilidade.....	30
4.3.1	Critério de Inclusão.....	30
4.3.2	Critério de Exclusão.....	31
4.4	Procedimentos.....	31
4.4.1	Coleta.....	31
4.4.2	Diagnóstico Molecular da <i>Chlamydia trachomatis</i>	32
4.4.2.1	Extração do DNA.....	32
4.4.2.2	Amplificação controle do DNA.....	34
4.4.2.3	Oligonucleotídeos (<i>Primers</i>).....	35

4.4.2.4	Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico da <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
4.5	Análise dos Resultados	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Viabilidade das amostras	39
5.2	Faixa etária	39
5.3	<i>Chlamydia trachomatis</i> e lesões cervicais pré-malignas ou malignas	40
5.4	Frequência de <i>C. trachomatis</i> em amostras com HPV	42
5.5	Tipo de lesão e coinfeção CT e HPV	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A	61

1. INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* (CT), bactéria pertencente à família Chlamydiaceae, é considerada agente de uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais frequentes em todo o mundo, além de facilitar o contágio do vírus HIV (GALVIN; COHEN, 2004; MOLANO et al., 2004). Suas manifestações podem gerar tracoma, linfogranuloma venéreo e infecções genitais. Em mulheres, causa a doença inflamatória pélvica (DIP) e longos períodos de infecção podem ocasionar infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005).

As infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* são de alta prevalência nos vários países do mundo, com conseqüências graves para população (WHO, 2002). Nos Estados Unidos, esta infecção é considerada uma DST frequente entre adolescentes do sexo feminino e mulheres jovens. Dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2005) apontaram 976.445 casos de infecções por clamídia, com estimativa, segundo Weinstock et al. (2004), de 2,8 milhões de novos casos por ano. No Brasil, estudos sobre as infecções genitais por *C. trachomatis* apontaram taxas de incidência de 2 a 47% (FRIAS et al., 2001). Em Manaus, Santos et al. (2003), estudando a infecção por clamídia em mulheres sexualmente ativas e Alfaia (2005), em gestantes, encontraram positivities de 20,6% e 11%, respectivamente, com diagnóstico através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Freitas (2007) registrou a taxa de 52,8% de positividade para infecção genital por *C. trachomatis* em mulheres com problemas de fertilidade.

Além das implicações relacionadas às infecções por *C. trachomatis*, é apontada a relação desta bactéria como um importante cofator, juntamente com o HPV, no desenvolvimento do carcinoma cervical (PAAVONEN; EGGERT-KRUSE, 1999). *C. trachomatis* age através de vários mecanismos, incluindo a modulação da imunidade do hospedeiro, o que contribui para o aumento do risco de neoplasia intraepitelial cervical associado ao HPV nas mulheres portadoras destes vírus (FINAN et al., 2006; BOSCH et al., 2002). Além disso, a infecção por *C. trachomatis* é considerada como um fator de risco para a persistência da infecção por HPV e possivelmente age como cofator associado ao HPV na alteração do epitélio cervical normal por induzir expressão de mediadores pró-inflamatórios, alterando a adesão e diferenciação celular.

O carcinoma cervical tem apresentado uma distribuição mundial, com aproximadamente 500.000 mulheres desenvolvendo esta patologia em todo o mundo, a cada ano. Em países em desenvolvimento, o carcinoma cervical é uma das primeiras causas de morte em mulheres, geralmente precedido por câncer de pele e de mama (IARC, 2007; INCA, 2005; WHO, 2005).

Na região Norte, observa-se uma alta incidência de câncer de colo uterino que, diferentemente dos outros locais do país, ultrapassa os índices do câncer de mama. A literatura relata como principal fator de risco para o câncer de colo de útero a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (GROSS; BARRASSO, 1999; ZUR HAUSEN, 1996; RIVOIRE et al., 2001; SCHIFMAN et al., 2005; SOLIMAN et al., 2005; WARTON; TORTOLERO-LUNA, 2000). Porém, o desenvolvimento e progressão até o câncer parecem ter interferência de vários fatores, entre eles a infecção por *C. trachomatis*. Desta forma, a

detecção diagnóstica de HPV, *C. trachomatis* e HIV são de alta relevância para determinar o papel destas DSTs no desenvolvimento do câncer cervical (FINAN et al., 2006; CASTELSAGUE et al., 2002),

Diante do exposto, e considerando a alta prevalência da infecção por *C. trachomatis* e sua importância como cofator do HPV no câncer cervical, este trabalho teve como finalidade detectar este agente em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas e malignas com diagnóstico prévio de HPV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Chlamydia trachomatis*

Pertencente à família Chlamydiaceae, classe das Clamídias, a *Chlamydia trachomatis*, uma bactéria Gram-negativa (Figura 1), é responsável pela etiologia de diferentes patologias associadas às doenças do trato urogenital, tracoma, linfogranuloma venéreo (LGV) e infecções genitais. Uma característica importante desta infecção é o caráter assintomático, descrita em 50% dos homens e 70% das mulheres. Indivíduos assintomáticos representam reservatórios crônicos do microrganismo e dificultam estudos epidemiológicos e a escolha de testes de detecção laboratorial que permitam a intervenção e controle da infecção (BLACK, 1997; MICHELON et al., 2005; SEADI et al., 2003).

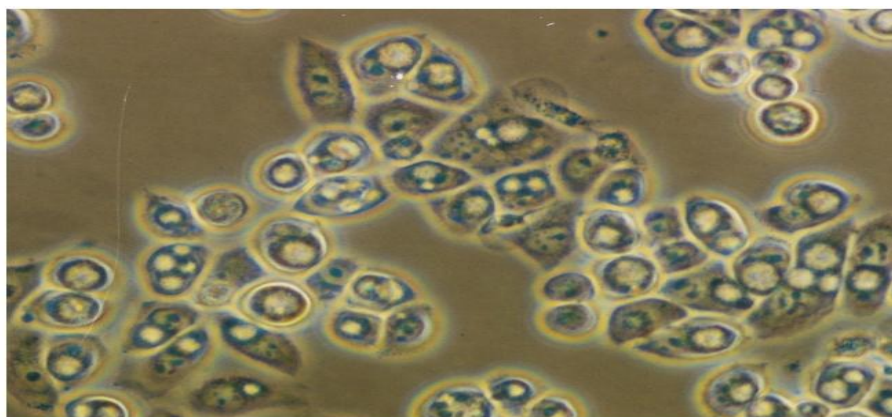


Figura 1. Fotografia digital tirada com microscopia óptica. Células infectadas com *Chlamydia trachomatis* em 24 horas após a infecção.
FONTE: SINGLA; BAL, 2006

As infecções do trato geniturinário por *Chlamydia trachomatis* são a principal causa de morbidade em mulheres sexualmente ativas e podem causar doenças como cervicite, endometrite, salpingite ou doença inflamatória pélvica (DIP), como consequência gravidez ectópica e infertilidade, parto prematuro e morte neonatal. Mais de 70% das mulheres com lesão tubária apresentam anticorpos circulantes para CT (GOLIJOW et al., 2005; MICHELON et al., 2005; SIMONETTI et al., 2009).

A infecção bacteriana pode ser adquirida através de relações sexuais ou pelo contato da mucosa com outra área infectada. No trato genital feminino, a CT tem afinidade pelas células do epitélio colunar, sendo a endocérvice seu principal alvo, podendo desempenhar papel em outras infecções como, por exemplo, incrementando o potencial oncogênico do HPV, principalmente no desenvolvimento de neoplasia cervical e aumento na incidência de câncer de ovário (CARVALHO et al., 2004; MADELEINE et al., 2006; MICHELON et al., 2005).

Os dois antígenos melhor relacionados ao diagnóstico e patogênese da infecção por CT são o antígeno lipopolissacarídico (LPS), mais encontrado nos corpos reticulares (RB), constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico, e o antígeno da proteína principal da membrana externa (MOMP). Os antígenos da MOMP, por serem espécies e subespécies-específicos, são utilizados para sorotipagem. As cepas de *Chlamydia trachomatis* foram classificadas em sorotipos ou sorovariantes por imunotipagem usando anticorpos policlonais ou monoclonais específicos (MOMP) (BARROS et al., 2007; MICHELON et al., 2005).

Atualmente, são conhecidas mais de vinte sorovariantes (Figura 2), nomeadas de acordo com as diferentes apresentações clínicas que apresentam: os sorotipos A, B, Ba e C se associam ao tracoma endêmico; L1, L2, L2a, L2b e L3 ao Linfogranuloma venéreo, uma grave doença invasiva com preferência para os tecidos linfáticos e D, E, F, G, H, I, J, K a infecções genitais e em neonatos (ANTILA et al., 2001; BARROS et al., 2007; MICHELON et al., 2005; FRIAS et al., 2001; SCHAEFFER; STAMM, 2008).

SOROTIPOS	DOENÇAS HUMANAS	FORMA DE DISSEMINAÇÃO	PATOLOGIA
A, B, Ba e C	Tracoma ocular, Tracoma endêmico	Mãos aos olhos, fomito e moscas	Conjuntivite
D, Da e E, F, G, H, I, Ia, J, Ja e K	Doença óculo genital, uretrite, Oftalmia, Cervicite, Bartholinite, Endometrite, Salpingite (DIP), Peri-hepatite, Pneumonia, Síndrome de Reiter e Cancer de colo uterino (?)	Sexual e perinatal	Cervicite, Uretrite, DIP, Infertilidade, Gravidez Ectópica, Conjuntivite Neonatal e Pneumonia infantil
L ₁ , L ₂ e L ₃	Linfogranuloma Venéreo	Sexual	Invasão da submucosa linfo-nodular com granuloma necrosante e fibrosis

Figura 2. Sorotipos da *Chlamydia trachomatis* e as doenças humanas.
FONTE: ANTILA et al., 2001; BARROS et al., 2007; FRIAS et al., 2001.

2.2 Ciclo de desenvolvimento na célula hospedeira

A *C. trachomatis* possui restrições metabólicas, sendo incapaz de sintetizar seu próprio ATP e necessitando de fonte de energia da célula hospedeira. Com vida intracelular obrigatória, a CT foi originalmente

considerada um vírus. Entretanto, diferentemente dos vírus, possui RNA e DNA (SEADI et al., 2002; SIMONETTI et al., 2009).

Na célula hospedeira, ocorre seu ciclo de desenvolvimento bifásico e replicação dentro de vacúolos (Figura 3), formando inclusões citoplasmáticas características. A replicação apresenta um ciclo multimórfico e sem sincronismo de desenvolvimento onde, dentro deste ciclo, ocorrem duas formas bem distintas: os corpos elementares (EB) e os corpos reticulares (RB) (SEADI et al., 2002; SIMONETTI et al., 2009; HAMMERSCHLAG, 2002).

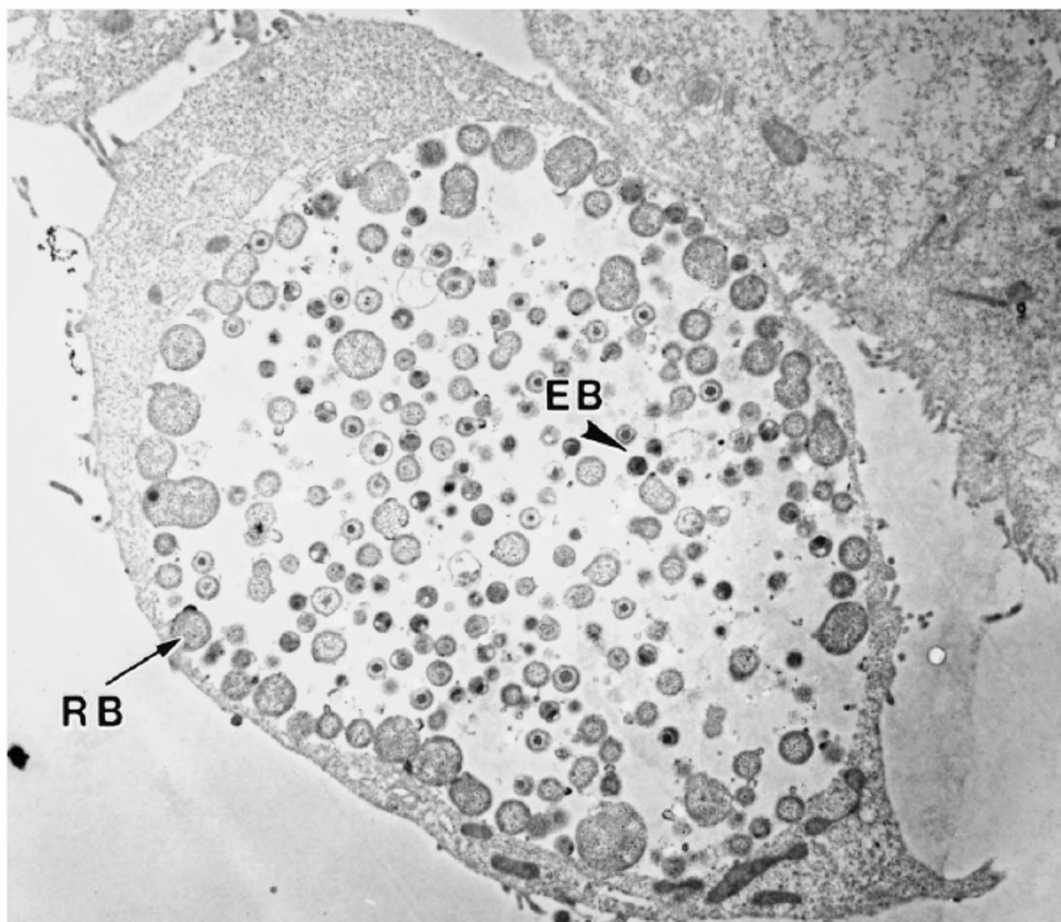


Figura 3. Células após 48 horas de infecção pela sorovariante L1 de CT. Os EB (corpos elementares), RB (corpos reticulados) e as formas intermediárias são evidentes dentro da inclusão. FONTE: STAGG, 1998.

Inicialmente, os corpos elementares, forma infecciosa, entram no endossoma da célula hospedeira depois de penetrar através de fagocitose, pinocitose ou endocitose mediada por receptores na superfície da célula epitelial suscetível à clamídia (IGANSI, 2005; SCHACTER; STAMM, 1999).

Aproximadamente oito horas após a entrada na célula, inicia-se a replicação por divisão binária, dando fim ao ciclo dentro do endossoma (Figura 4). Os corpos reticulares são maiores em tamanho e mais ricos em RNA, sendo a forma metabólica e não-infecciosa da CT. Em 24 a 72 horas, o RB retorna à forma EB, formando vacúolos contendo de 100 a 1.000 EB. Quando estes vacúolos substituem quase todo o citoplasma da célula hospedeira, ocorre lise e lançamento de EB para o meio extracelular, podendo dar início a um novo ciclo de infecção (BECKER, 2005; SCHACTER; STAMM, 1999; SEADI et al., 2002).

Os EB formados, ao serem liberados da célula, estão aptos a se adaptarem ao meio extracelular e as formas RB não resistem fora da célula, adaptando-se somente ao meio intracelular. Acredita-se que a CT sobreviva a fagocitoses e a destruição por enzimas lisossomais devido a sua parede celular, que é rica em cisteína e lipopolissacarídeo, protegendo-a no interior e fora das células (IGANSI, 2005; SIMONETTI et al., 2009).

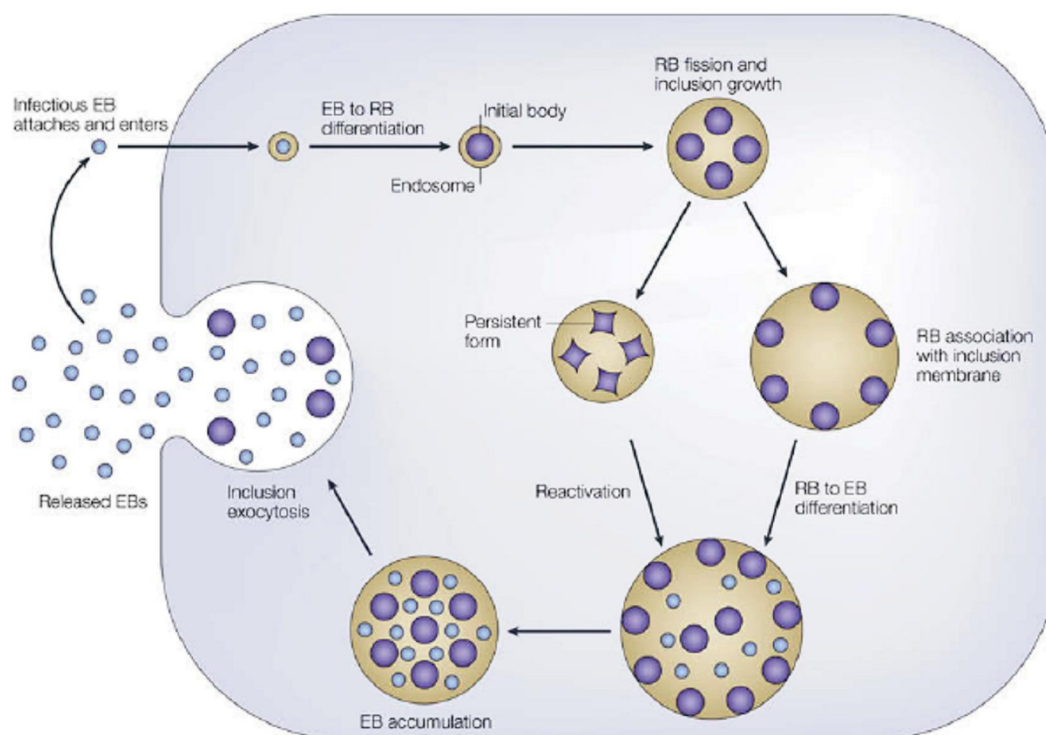


Figura 4. Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*
 FONTE: SIMONETTI et al., 2009

A *Chlamydia trachomatis* também possui proteínas antigênicas na membrana que induzem à ativação dos mecanismos imunológicos humorais e celulares, inclusive a produção de imunoglobulinas específicas das classes IgA, IgM e IgG, bem como cromocitocinas, interleucinas, interferons e o fator de necrose tumoral. Com ataques antigênicos repetidos ou prolongados, as interações entre os antígenos clamidiais e a defesa imunológica celular do hospedeiro geram a formação de cicatrizes por *C. trachomatis* (FRIAS et al., 2001).

Existem múltiplos mecanismos imunes necessários para conseguir imunidade protetora à CT. Imediatamente após uma reinfecção, ocorre uma resposta imune pelos anticorpos circulantes que tem a capacidade de penetrar em algumas células, bloqueando a capacidade dos EBs penetrarem no epitélio

colunar das células do trato genital ou da conjuntiva (FRIAS et al., 2001; LOOMIS; STARNBACH, 2002).

Segundo Simonetti et al. (2009), a imunidade adquirida ocorre através dos linfócitos T por diversos mecanismos, com fortes indícios envolvidos na imunidade mediada pelas células Th1 e por citocinas IL-2, IL-12 e IFN-...após uma infecção por CT. A citocina IFN-...é capaz de inibir o crescimento de *C. trachomatis* em cultura de células. Essa molécula também regula a fagocitose de macrófagos e o potencial de expressão do complexo MHC. As células T CD4 e CD8 são ativadas especificamente após o reconhecimento de peptídeos do complexo MHC classe II, podendo inibir diretamente a replicação de CT bem como estimular a função protetora de uma variedade de outras células imunes e inflamatórias (LOOMIS; STARNBACH, 2002).

A infecção é mais prevalente em adultos jovens, apresentando alto risco de infecção desde o início da vida sexual, e a imunidade desenvolvida é parcialmente protetora considerando-se os sorotipos da *C. trachomatis*. Episódios sucessivos de infecção aumentam o risco de se desenvolver sequelas e a chance de se contrair a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (ALBRING et al., 2006; EULETÉRIO et al., 2007).

Mulheres imunodeprimidas estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões cervicais. O elo entre doenças relacionadas ao HIV ao HPV e outras DSTs é muito forte, pois as infecções são transmitidas sexualmente e as populações de risco possuem muitas características em comum. O baixo número de linfócitos T CD4+ (menos de 200 células/ml) está associado a infecção por CT; isto ocorre pela reação inflamatória causada pela bactéria, promovendo o acesso aos linfócitos T CD4 (IGANSI, 2005; PINTO et al., 2002).

Uma predominância mais elevada de CT foi encontrada em amostras HPV-positivas. Estudos têm demonstrado que infecções por HPV de alto risco juntamente com a *Chlamydia trachomatis*, quando associados, podem causar hiperplasia cervical em mulheres com ou sem neoplasia intra-epitelial cervical e carcinoma invasivo (FINAN et al., 2006; NAUCLER et al., 2007).

2.3 Epidemiologia

A infecção por *Chlamydia trachomatis* (CT) é uma das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) mais comuns e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram, anualmente, mais de 90 milhões de casos novos de infecções por clamídia em todo o mundo, tendo como prevalência países pobres e populações excluídas das grandes áreas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; RAMOS et al., 2003; SEADI et al., 2002).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, estimam que existam mais novos casos diagnosticados de clamídia do que qualquer outra DST, incluindo sífilis, gonorréia, condiloma culminado, herpes e AIDS, prevendo que ocorra entre 3 a 4 milhões de casos novos de clamídia por ano, atingindo principalmente adolescentes sexualmente ativos (PASSOS, 2007; SEADI et al., 2003).

No Brasil, existem muitos dados que demonstram estudos da infecção por clamídia, porém não existe estudo documentando a situação global da infecção, pois a doença ainda não é de notificação compulsória. As publicações na literatura científica sobre a prevalência da infecção são estudos isolados, em populações específicas, em serviços determinados, utilizando-se

geralmente testes de detecção molecular, que demonstram a importância dessa epidemia silenciosa em nosso meio e triagens populacionais. A Tabela 1 apresenta prevalências de CT encontrada em mulheres brasileiras (BECKER, 2005; OLIVEIRA et al., 2008; PASSOS, 2007).

Prevalência	Autor	N	Ano	Local	População	Método diagnóstico
18,0%	Gonçalves Raddi <i>et al</i>	142	1993	Araraquara/SP	Ambulatório ginecologia	Cultura endocérvice
4,0%	Passos <i>et al</i>	186	1995	Porto Alegre/RS	Planejamento Familiar	IFD
9,0%	Amaral <i>et al</i>	122	1995	São Paulo/SP	Pré-natal	ELISA
2,1%	Simões <i>et al</i>	328	1997	Campinas/SP	Pré-natal	IFD ¹
6,6%	Faundes <i>et al</i>	407	1998	Campinas/SP	Planejamento familiar	IFD
8,4%	Moherdaui <i>et al</i>	348	1998	Multicêntrico ²	Serviços DST	IFD
8,5%	Lowndes <i>et al</i>	796	1999	Rio de Janeiro/RJ	Ambulatório ginecologia	IFD/ELISA
13%	Miranda <i>et al</i>	119	2000	Vitória/ES	Penitenciária feminina	ELISA
8,9%	Melles <i>et al</i>	189	2000	São Paulo/SP	Ambulatório ginecologia	Cultura endocérvice
18,5%	Varella <i>et al</i>	108	2000	Pirai/RJ	Ambulatório ginecologia	ELISA
5,0%	Frias <i>et al</i>	100	2002	Teresópolis/RJ	Clinica particular	ELISA
3,2%	Bastos <i>et al</i>	123	2002	Rio de Janeiro/RJ	Clinica particular	ELISA
20,2%	Smith <i>et al</i>	424	2002	São Paulo/SP	Ambulatório CA cervical	IFD
11,4%	Miranda <i>et al</i>	149	2002	Vitória/ES	PSF ³ – Adolescentes	LCR ⁴
0,6%	Ramos <i>et al</i>	155	2002	Porto Alegre/RS	PSF – Mulheres	PCR ⁵
19,6%	Araujo <i>et al</i>	296	2002	Goiânia/GO	Ambulatório ginecologia	PCR

Tabela 1. Taxas de prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* em mulheres brasileiras relatadas na literatura.

Legenda: 1- Imunofluorescência Direta; 2ñ Estudo Multicêntrico: Manaus, Recife, Belo Horizonte, São Paulo e Porto Alegre; 3ñ PSF: Programa de Saúde da Família; 4ñ LCR: Reação em Cadeia de Ligase; 5- PCR: Reação em Cadeia de Polimerase.

Fonte: Passos, 2007.

Em Manaus, um estudo realizado por Santos *et al.* (2003) em 121 mulheres usuárias de um serviço de DST evidenciou 20,7% de positividade para CT e, segundo Freitas (2007), a prevalência de *Chlamydia trachomatis* foi de 50,2% em mulheres com problemas de infertilidade. Ambos os estudos foram realizados através da técnica de PCR, com diferença do segundo, que utilizou Platinum Taq DNA polimerase *High Fidelity*. O tracoma ativo ou inativo foi encontrado em 33% dos habitantes da Amazônia, mediante trabalho clínico-epidemiológico (ISHAK, 2001).

O grupo mais acometido pela infecção por clamídia são as mulheres sexualmente ativas entre os 18 a 25 anos, chegando a atingir 40% em clínicas de DST que atendem adolescentes. A OMS preconiza a realização de exames preventivos em pelo menos 85% da população feminina desta faixa etária. Porém, estima-se que, no Brasil, apenas 8% a 10% das mulheres incluídas nesse grupo realizam o exame preventivo (BECKER, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; SEADI et al., 2002).

Os fatores associados à suscetibilidade de infecção nesta faixa etária estão relacionados às diferenças anatômicas na cérvix uterina de mulheres jovens e mulheres mais adultas, o que favorece a exposição à clamídia, além de baixa condição sócio-econômica, etnia negra, grande número de parceiros sexuais, o não uso de preservativos e infecção gonocócica concomitante (MADELEINE et al., 2006; BLACK, 1997).

2.4 *Chlamydia trachomatis* como cofator para o câncer cervical

O câncer de colo uterino é um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, e ainda é o segundo tipo de câncer feminino mais incidente no Brasil e no mundo, embora seja uma doença que possa ser prevenida através do exame de Papanicolau (BOSCH et al., 2002; IARC, 2002; INCA, 2005).

O HPV está presente em 99,7% dos casos de câncer do colo do útero e é considerado o agente sexualmente transmissível mais comum em vários países, além de ser relacionado como agente causal deste tipo de câncer. A *Chlamydia trachomatis* é apontada como um importante cofator do HPV no

desenvolvimento do carcinoma cervical. Vários estudos têm demonstrado uma maior prevalência de CT em amostras HPV-positivas quando comparadas a amostras HPV-negativas (BARROS et al., 2007; FERREIRA DE PAULA et al., 2007; FINAN et al., 2006; MADELEINE et al., 2006).

As evidências epidemiológicas sugerem que os tipos de HPV considerados de alto risco (HPV16, HPV18, HPV 31 e HPV 33) e a CT, em particular os sorotipos de D a K, principalmente o sorotipo G, possuem um papel central na etiologia da neoplasia intraepitelial cervical e, subsequente, no carcinoma cervical (BARROS et al., 2007; FERREIRA DE PAULA et al., 2007; TAMIM et al., 2002),.

A infecção por *Chlamydia trachomatis* parece tornar mais suscetível à infecção por HPV em um nível basal por facilitar o acesso deste vírus às células epiteliais basais por micro-abrasões ou por alterar as características das células epiteliais, aumentando a carga viral da infecção e facilitando a persistência de uma nova infecção (BARROS et al., 2007).

A infecção concorrente por *Chlamydia trachomatis* pode impedir a resolução da infecção por HPV através de uma indução de um padrão da resposta imune do tipo humoral (ALBRING et al., 2005). A modulação da resposta imune humoral pela *Chlamydia trachomatis* facilita os mecanismos de evasão desenvolvidos pelo próprio HPV, como a menor expressão de genes virais para reconhecimento imunológico, dificultando assim o reconhecimento pelas células imunocompetentes, diminuição da expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, superexpressão da proteína oncogênica viral E7, que inibe a apresentação de antígenos pelas células dendríticas, menor suscetibilidade das células infectadas à lise mediada por

linfócitos T citotóxicos, além da evasão dos efeitos de inibição do crescimento provocado pelas citocinas (BARROS et al., 2007; NAUCLER et al., 2007).

A associação de infecções por *Chlamydia trachomatis* e HPV, concomitantemente, relacionam-se com o aumento da expressão de Ki 67, um marcador de proliferação celular presente no núcleo de células em fase de multiplicação, no epitélio. A infecção por *Chlamydia trachomatis* também aumenta a expressão de HPV16 nas neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), indicando que esta infecção modifica a atividade do vírus (FERREIRA DE PAULA et al., 2007; MADELEINE et al., 2006). Além disto, a infecção por *Chlamydia trachomatis* aumenta a expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento transformante β (TGF- β) o que pode potencializar os mecanismos envolvidos na carcinogênese cervical (BARROS et al., 2007).

Por outro lado, acredita-se ainda que uma modulação da resposta imune e/ou precipitação de uma resposta inflamatória causada pelo HPV favoreça a uma subsequente infecção por CT, aumentando a taxa de infectividade por esta bactéria em mulheres HPV positivas (HAMMERSCHLAG, 2002).

Estudos demonstram que o sorotipo G é o que mais se associa ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas e que o aumento de exposições aos diferentes sorotipos também aumenta o risco de lesões no colo do útero, reforçando as evidências de que há uma relação entre infecção por CT e carcinoma de células escamosas (ANTTILA et al., 2001).

Não está claro se a CT atua somente como um cofator para o HPV ou se ela é um fator de risco independente. Porém, estudos soroepidemiológicos têm fornecido provas de que infecção por *Chlamydia trachomatis* é um fator de

risco independente para o desenvolvimento das células invasoras escamosas no desenvolvimento do carcinoma cervical devido à modulação na imunidade do hospedeiro e inflamações crônicas causadas pela infecção (ANTTILA et al., 2001; ISHAK, 2001; NODA et al., 2002; SEADI et al., 2002; SEADI et al., 2003).

2.5 Métodos de detecção para *Chlamydia trachomatis*

A maior dificuldade no diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis* é o caráter assintomático desta. Os anticorpos de CT podem persistir por vários anos e possuem vários testes de imunodetecção para diagnóstico (ANTILLA et al., 2008; HAMMERSCHLAG, 2002; SEADI et al., 2003).

Entre os métodos laboratoriais disponíveis para o diagnóstico direto e indireto da infecção por CT estão os de cultura, que é o método de referência (*gold standard*), com especificidade próxima a 100%, mas apresenta dificuldades de padronização e necessidade de estrutura de laboratório onerosa, tempo elevado para obter os resultados e baixa sensibilidade. Outros métodos são a pesquisa de antígenos através dos testes de imunofluorescência direta (IFD) e ensaio imunoenzimático (EIA), pesquisa de ácidos nucleicos através de métodos de sonda de DNA e amplificação, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e a pesquisa de anticorpos através dos métodos de imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência indireta (MIF) e ensaio imunoenzimático indireto (EIA). (MADELEINE et al., 2006; MICHELON et al., 2005; NODA et al., 2002; SEADI et al., 2002).

A vantagem da PCR para a detecção de CT em amostras clínicas é sua maior sensibilidade (91%) e especificidade (100%) para o gênero e grupo, frente aos métodos de imunodetecção. Comparada ao isolamento do patógeno em cultivo celular, os métodos moleculares são mais rápidos, apresentam maior sensibilidade e especificidade semelhante e não exigem cuidados de armazenamento para conservar a viabilidade das amostras (FILHO; REMUALDO, 2007; SEADI et al., 2003).

Desta forma, com a finalidade de detectar a CT em amostras de pacientes com lesões pré-malignas e malignas e com diagnóstico prévio de HPV utilizando-se a técnica da PCR, pois a CT é considerada importante cofator do HPV no desenvolvimento do Carcinoma cervical, este estudo foi proposto.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Detectar *Chlamydia trachomatis* em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na FCECON-AM.

3.2 Específicos

- Verificar a faixa etária das pacientes portadoras de lesões cervicais pré-malignas ou malignas;
- Relacionar a frequência de *C. trachomatis* com a detecção de HPV;
- Relacionar a frequência de HPV, *C. trachomatis* e a lesão da paciente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Estudo descritivo transversal, que visou investigar a frequência de *Chlamydia trachomatis* em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na FCECON-AM.

4.2 Amostras

As amostras utilizadas são oriundas do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular ã CAM ã UFAM, cujo diagnóstico para HPV já foi realizado em dissertação e que fazem parte do projeto PPP intitulado ãImportância do diagnóstico molecular no contexto das doenças sexualmente transmissíveis, aprovado pelo CEP UFAM em 05 de julho de 2007, com CAAE nº 0188.0.115.000-07.

Para obtenção destas amostras, foi coletado o material cervical de mulheres participantes de estudos passados, totalizando 153 mulheres.

4.3 Critérios de Elegibilidade

4.3.1 Critério de Inclusão

Amostras positivas para DNA genômico.

Pacientes com diagnóstico histopatológico de lesão pré-maligna ou maligna do colo do útero: neoplasia intra-epitelial I (NIC I), NIC II, NIC III, carcinoma invasor e adenocarcinoma.

4.3.2 Critérios de Exclusão

Amostras negativas para DNA genômico.

Amostras esgotadas, que não tinham quantidade suficiente para análise.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Coleta

As amostras foram coletadas, em estudo anterior, da endocérvice das mulheres participantes com escova cervical descartável tipo *cito-brush*, sendo transferidas para um microtubo descartável de 1,5 mL contendo 400 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM), o qual foi hermeticamente fechado. As amostras foram mantidas em banho de gelo até serem encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sendo armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA e execução dos procedimentos da PCR.

4.4.2 Diagnóstico Molecular da *Chlamydia trachomatis*

As etapas executadas no laboratório de Diagnóstico Molecular estão organizadas no fluxograma a seguir:

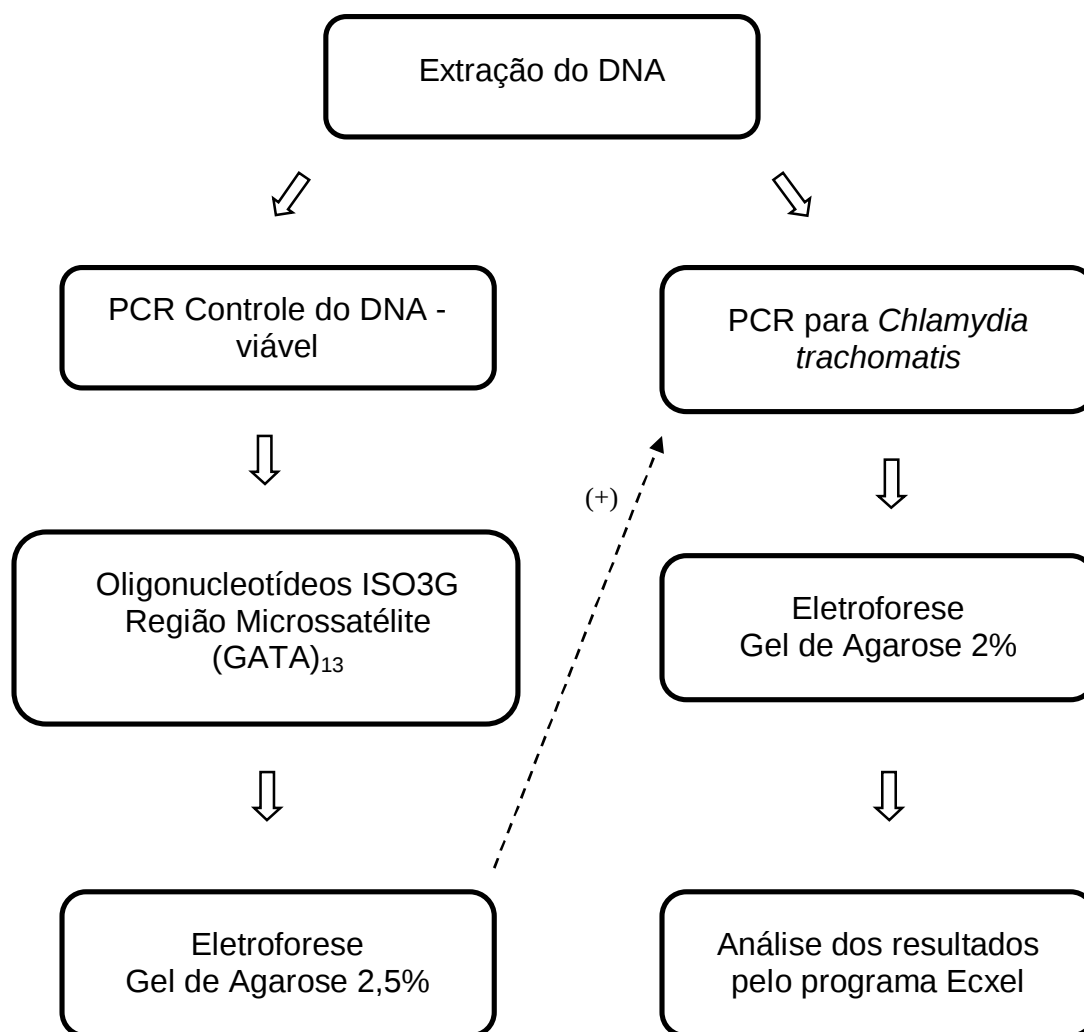


Figura 5. Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular ã CAM ã UFAM.

4.4.2.1 Extração do DNA

As amostras mantidas a -20°C foram colocadas à temperatura ambiente para a posterior execução da extração do DNA. Para a extração do DNA, foram

adicionados 400 μ L da solução Tampão Proteolítico (TPK) em cada microtubo de cada amostra para digestão de grande parte das proteínas presentes. A solução de TPK consistiu em uma mistura de 900 μ L de TE, 100 μ L de Tween 20 a 20% e 20 μ L de proteinase K 10 mg/mL. Essa mistura foi levada ao banho-maria a 55°C por 1 hora e depois fervida por 10 minutos (BAUER; MANOS, 1998).

As amostras contendo sangue foram submetidas à extração por fenol-clorofórmio, onde foi adicionado 400 μ L de Fenol Hidratado a 400 μ L de cada amostra que já havia sido previamente digerida com proteinase K, então se homogeneizou suavemente por 10 minutos seguidos de 10 minutos de centrifugação a 12.000 rpm. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 μ L de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se essa mistura por 10 minutos, seguidos de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e foi adicionado 400 μ L de Clorofórmio Hidratado 1:1, então se agitou as amostras por 10 minutos seguida de uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 1/10 (10%) do volume do sobrenadante de NaCl 3M e 1000 μ L de Etanol Absoluto gelado. Por fim, as amostras foram precipitadas a -20°C por 12 horas.

No dia seguinte, o material precipitado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos, descartando-se o sobrenadante cuidadosamente. Lavou-se o sedimento de DNA (pellet) com 500 μ L de Etanol a 70% gelado, centrifugou-se a 8.000 rpm por 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Após centrifugação, secou-se o sedimento por

aproximadamente 40 minutos no fluxo laminar e, por fim, ressuspendeu-se o sedimento de DNA com 50 µL de água Milli-Q.

Após o procedimento de extração, as amostras foram processadas para o diagnóstico molecular ou mantidas a -20°C.

4.4.2.2 Amplificação controle do DNA

Para confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado nas amostras para as reações de PCR, foi utilizado um par de oligonucleotídeos, amplificando uma região microsatélite (GATA)₁₃ do cromossomo 15 humano ã ISO3G (PONTES, 2003).

O sistema de reação foi composto de:

Reagentes	Volume
Água ultra purificada	2,2 µL
Tampão da enzima 5X	2,5 µL
dNTP 2,5 mM	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mM	2,5 µL
Primer ISO 3G (265pb)	5,0 µL
<i>GOLD Taq</i> DNA polimerase 5U/µL	0,3 µL
DNA	5,0 µL
Volume final	20 µL

As reações de PCR foram realizadas com 40 ciclos de amplificação em aparelho *Verite 96 Well thermal cycler* - *Applied Biosystems*, conforme o

seguinte programa: quarenta segundos à 94°C para desnaturação, um minuto à 62°C para anelamento e um minuto e trinta segundos à 70°C para a síntese. Após os 40 ciclos, seguiram-se por uma hora a 60°C para extensão.

Após a amplificação com ISO3G, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5 % (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas correspondentes a 265 pb (PONTES, 2003) foram reveladas por luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

4.4.2.3 Oligonucleotídeos (*Primers*)

Para o diagnóstico da *Chlamydia trachomatis*, a reação de PCR utiliza os oligonucleotídeos KL1 e KL2, que amplificam um fragmento de 241pb de DNA plasmidial da *C. trachomatis*, onde se encontra a parte mais conservada do seu DNA, descritos por Mahony et al. (1993) e Schachter (1997). As sequências dos *primers* utilizados estão apresentadas a seguir:

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA (5' a 3')
KL 1	TCCggAgCgAgTTACgAAgA
KL 2	AATCAATgCCCgggATTggT

A amplificação de DNA, na detecção da clamídia, é o método de eleição por sua maior sensibilidade, especialmente quando dirigida ao plasmídio que proporciona de 7 a 10 cópias de DNA por bactéria e apresenta-se em 99% das linhagens (SEADI et al., 2003).

4.4.2.4 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico da *Chlamydia trachomatis*

A reação de PCR foi processada no equipamento *Verite 96 Well thermal cycler - Applied Biosystems*. O sistema para a PCR é composto por 5µL de DNA da amostra; 5 µL do tampão 10x; 2,0 µL de MgSO₄ (50 mM), 5µL do *primer forward* KL1 (5 pmol); 5 µL do *primer reverse* KL2 (5 pmol); 1,0 µL de dNTP 10 mM; 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase *High Fidelity* 5U/µL e 26,8 µL de água Milli-Q para completar o volume final de 50 µL. Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (água Milli-Q) e um controle positivo com uma amostra positiva para *C. trachomatis* (sequenciada) do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

O equipamento foi programado para executar o seguinte termociclo:

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Pré-desnaturação	94°C	30 segundos	
Desnaturação	94°C	30 segundos	} 40 CICLOS
Anelamento	64°C	30 segundos	
Extensão	68°C	120 segundos	
Extensão final	68°C	5 minutos	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Tempo indefinido	

Terminada a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% ou armazenadas para posterior procedimento.

- Eletroforese em gel de agarose 2%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão TEB 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas que correspondem a 241 pb são visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

4.5 Análise dos Resultados

A frequência da CT encontrada nas pacientes foi analisada em gráficos e tabelas relacionando-se com a frequência de positividade para HPV, idade das pacientes e lesão. Estes dados foram avaliados no programa Microsoft Office Excel 2003.

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade das amostras

Das 153 amostras, todas se encontraram viáveis, ou seja, 100% das amostras foram positivas para DNA genômico (Figura 6), as quais foram submetidas a procedimentos de PCR para *Chlamydia trachomatis*.

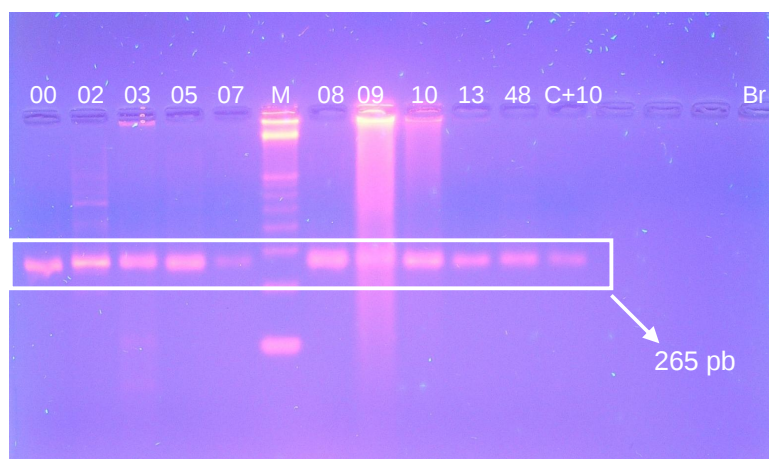


Figura 6: Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio dos produtos amplificados por PCR para detecção molecular de DNA genômico utilizando o iniciador ISO 3G, que amplifica um fragmento de 265 pb (M= Marcador; C+ = Controle Positivo; Br= Branco).

5.2 Faixa etária

As pacientes do presente estudo se encontram na faixa etária dos 17 aos 73 anos, com predominância de 38% (n=58/153) no intervalo de 27 a 36 anos (Gráfico 1).

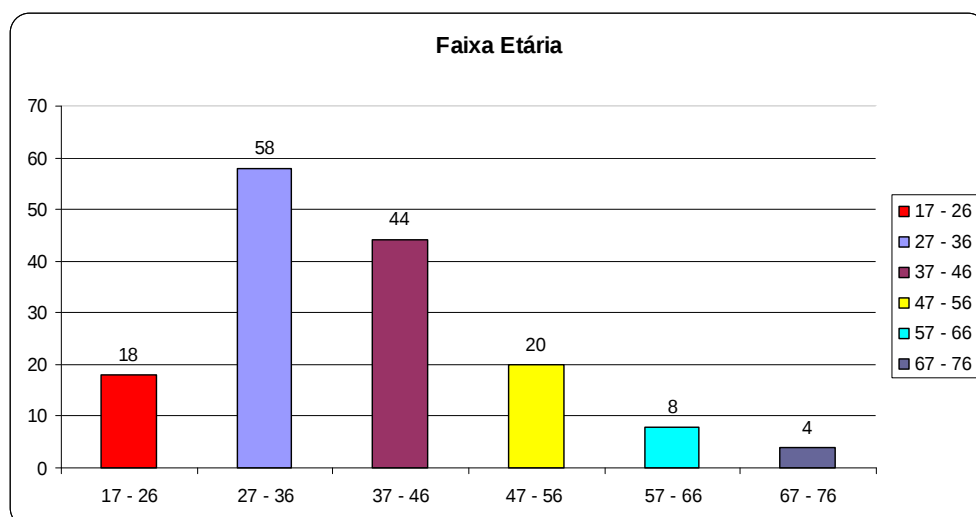


Gráfico 1. Distribuição das mulheres em estudo quanto à faixa etária.

5.3 *Chlamydia trachomatis* e lesões cervicais pré-malignas ou malignas

Dentre as 153 amostras, 41 são positivas para CT (Figura 7), observando-se uma frequência de 26,8% de CT nas amostras de pacientes com lesões pré-malignas ou malignas (Gráfico 2).



Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, dos produtos amplificados por PCR para diagnóstico molecular de *Chlamydia trachomatis*, utilizando os iniciadores KL1 e KL2, que amplificam um fragmento de 241 pb (M= Marcador; Br= Branco; 134, 139, 145 = Amostras Positivas).

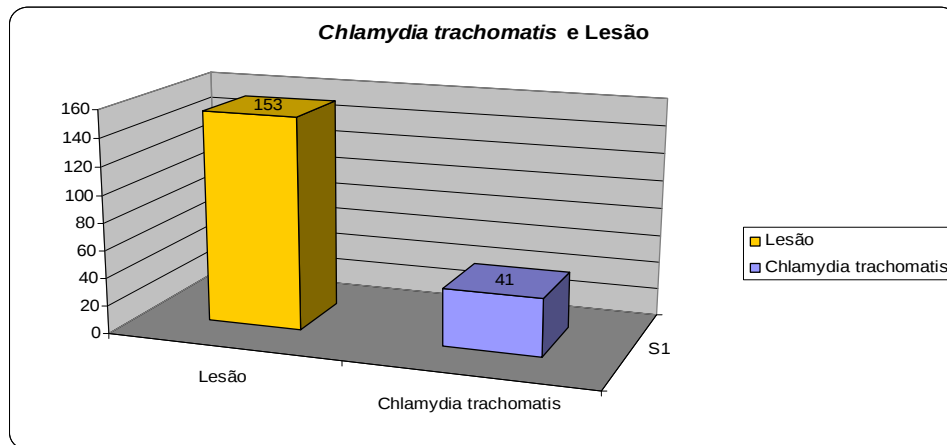


Gráfico 2. Distribuição da população em estudo quanto à infecção por *Chlamydia trachomatis* e lesões pré-malignas ou malignas.

Pode-se observar que a faixa etária de predominância nas pacientes com infecção por *Chlamydia trachomatis* é dos 27 aos 36 anos (47%) (n=19/41) (Gráfico 3).

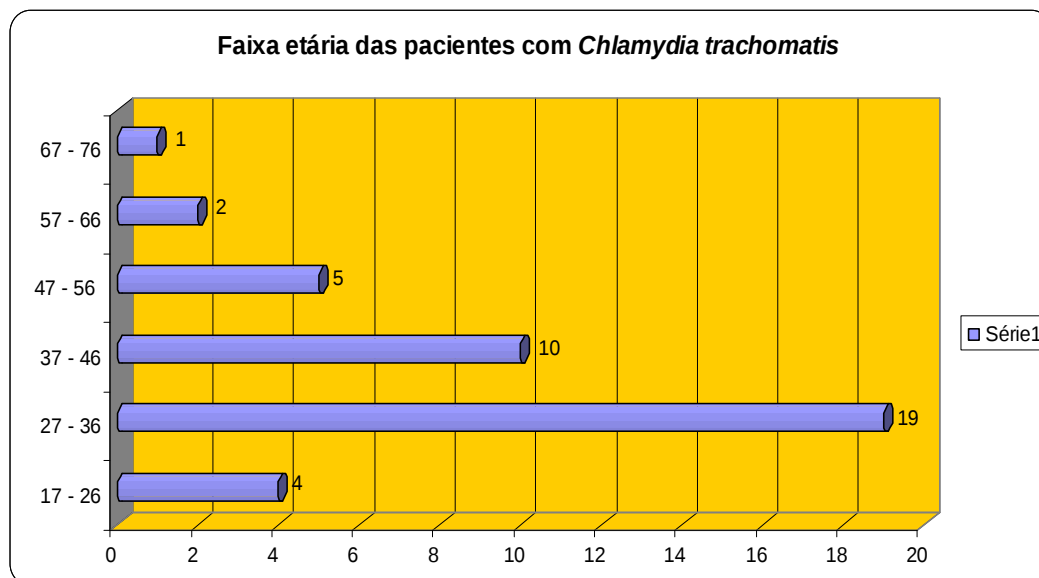


Gráfico 3. Distribuição da faixa etária das pacientes com infecção por *Chlamydia trachomatis* e lesões pré-malignas ou malignas.

5.4 Frequência de *C. trachomatis* em amostras com HPV

Estudo anterior (Ferreira, 2007) mostrou que, das 153 amostras de pacientes com lesões pré-malignas ou malignas analisadas, 97% (n=149) destas foram HPV-positivas e, no presente estudo, observou-se uma prevalência de 27,5% (n=41) de amostras positivas para CT (Gráfico 4). A faixa etária predominante das pacientes com co-infecção CT e HPV foi a mesma observada nas pacientes que são CT-positivas (27 aos 36 anos). Não foi detectado CT em amostras HPV-negativas (Gráfico 3).

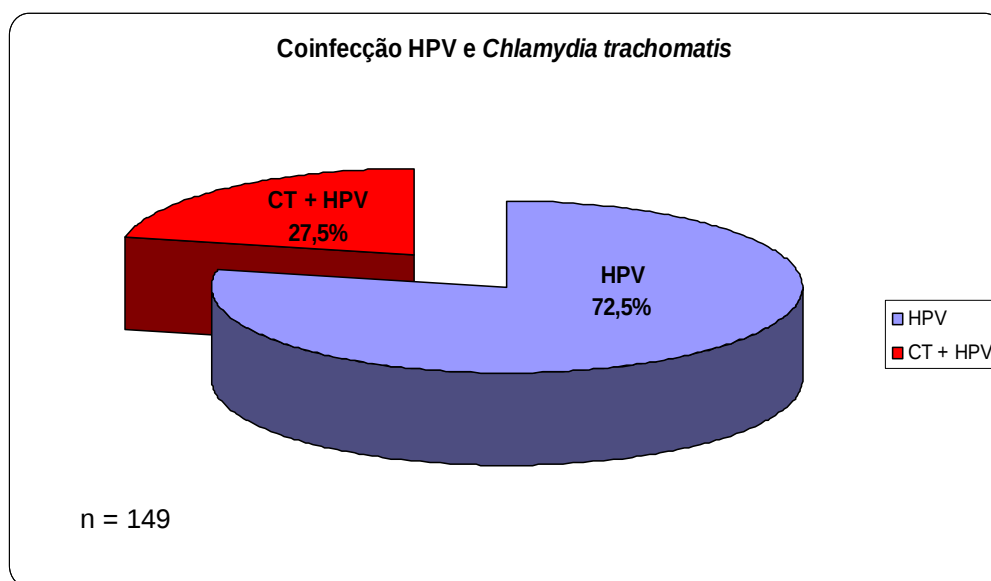


Gráfico 4. Co-infecção HPV e *Chlamydia trachomatis* em 149 amostras HPV-positivas.

5.5 Tipo de lesão e co-infecção CT e HPV

Das 41 amostras com co-infecção CT e HPV, a predominância do tipo de lesão nas pacientes é neoplasia intra-epitelial cervical III (NIC III), com 59%, seguido de 32% de NIC II, 7% de neoplasias e 2% ou NIC I (Gráfico 5).

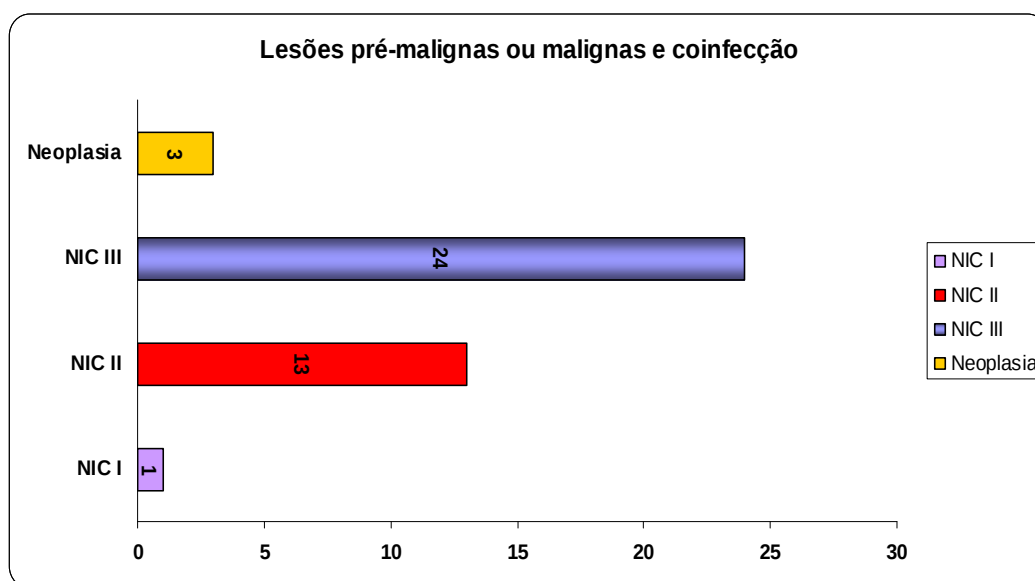


Gráfico 5. Distribuição do grau de lesão cervical nas pacientes com co-infecção *Chlamydia trachomatis* e HPV.

6. DISCUSSÃO

A infecção por *Chlamydia trachomatis* tem sido associada à hiperplasia de células de reserva e metaplasia, processos relacionados à carcinogênese cervical quando associadas ao HPV (BARROS et al., 2007). O presente estudo relata frequência de CT em pacientes com lesões pré-malignas ou malignas de colo de útero e com HPV (97%).

Após a análise das 153 amostras de mulheres portadoras de lesão cervical pré-maligna ou maligna do colo do útero atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas, pode-se observar que em 26,8% (n=41/153) das pacientes estudadas detectou-se *Chlamydia trachomatis* e em 27,5% (n=41/149) verificou-se a co-infecção HPV/CT.

Tamim et al. (2002), num estudo de co-infecções cervicais com o papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* através de detecção por PCR em amostras endocervicais em 149 mulheres, observaram que, de 49 amostras HPV-positivas, 29 (74,3%) eram CT-positivas. A maior taxa de co-infecção observada neste estudo foi na faixa etária de 31 a 40 anos.

Araújo e Guimarães (2002), em um estudo feito apenas em adolescentes através de amplificação de DNA clamidial, observaram prevalência de 19,6% de positividade para CT.

Segundo apontado por Deluca et al. (2006), a infecção por CT é mais frequente em mulheres mais jovens, o que pode ser explicado pela exposição da junção escamocolumnar da cérvix, favorecendo à infecções. No presente estudo, observa-se uma maior frequência de CT nas pacientes cuja faixa etária encontra-se entre 17 e 36 anos (n=23/41).

Num estudo realizado em Fortaleza por Eleutério et al. (2007), através do método de Captura Híbrida para detecção de *Chlamydia trachomatis* em serviço privado, detectou-se 6,08% de mulheres CT-positivas. A faixa etária mais incidente foi dos 26 aos 30 anos. As pacientes assintomáticas representaram 6,2% dos casos e, pacientes com suspeita clínica, 5,7%. As pacientes estudadas por Eleutério et al. (2007) foram as que procuraram o serviço privado de ginecologia por qualquer motivo, já as pacientes do presente estudo são mulheres com lesões de colo de útero e alta prevalência de HPV, além da necessidade de se destacar a alta sensibilidade da PCR para detecção de CT frente a outros métodos.

Oliveira et al. (2008), em estudo com 70 mulheres (35 com lesão intra-epitelial cervical e 35 normais), detectaram 58,6% de infecção por CT pelo método de PCR *real-time* e 47,1% pelo método de Imunofluorescência direta. Das 35 pacientes com lesão intra-epitelial, a frequência de *Chlamydia trachomatis* foi de 80% (n = 28), frequência esta bem superior à do presente estudo e outras apontadas na literatura (PASSOS, 2007).

Deluca et al. (2005), na Argentina, em um estudo através da técnica de PCR para detecção de CT e HPV com 189 mulheres sexualmente ativas entre 15 e 58 anos de idade, com alteração citológica em uma região com alta incidência de câncer de colo do útero, observaram a prevalência de *C. trachomatis* de 24,9%, e de infecção pelo HPV de 52,9%, dados que se aproximam aos do presente trabalho em relação à frequência de CT, mas que diferem em relação à HPV, onde foi detectado 97% deste vírus nas pacientes estudadas. Essa diferença pode estar relacionada ao maior número de

mulheres participantes do presente estudo com lesões do tipo NICIII e de todas possuírem lesão cervical, cujo diagnóstico foi definido histopatologicamente.

Um estudo na cidade de Porto Alegre com 1217 amostras de material do colo de útero de mulheres assintomáticas e submetidas a exames histopatológicos e de PCR detectou prevalência de 28,4% de HPV-positivas, 12,6% de CT-positivas e co-infecção por CT e HPV de 6,5%, com citologia anormal significativa tanto em HPV-positivas quanto na co-infecção (IGANSI, 2005). Os dados de frequência de CT e co-infecção CT/HPV diferem dos do presente estudo devido ao tipo de população estudada por aquele, ou seja, mulheres assintomáticas.

Segundo Finan et al. (2006), Giuliano et al. (2001) e Smitch et al. (2002), infecções por *C. trachomatis* são mais prevalentes entre as mulheres HPV-positivas, mulheres com múltiplos parceiros sexuais, fumantes ou que tem citologia anormal.

A presença da *Chlamydia trachomatis* está associada a alterações citológicas da endocérvice uterina e a história de DST deve ser valorizada no tratamento e no seguimento clínico (OLIVEIRA et al., 2008).

Provavelmente, pela sua modulação na imunidade do hospedeiro e inflamações crônicas, a CT sugere um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo de útero, além da infecção por CT ser um fator predisponente para infecção do HPV ou vice-versa (OLIVEIRA et al., 2008). Desta forma, as pacientes com a associação do HPV com a CT provavelmente apresentam maior risco de desenvolverem o câncer de colo de útero.

O presente estudo apresenta uma frequência de *Chlamydia trachomatis* em pacientes HPV-positivas com lesões pré-malignas ou malignas que se

aproximam dos dados de outros estudos, principalmente daqueles realizados em pacientes com lesões cervicais (PASSOS, 2007). É provável que CT e HPV sejam cofatores relacionados às doenças sexualmente transmissíveis e no desenvolvimento do câncer (TAMIM et al., 2002; FILHO; REMUALDO, 2007).

Embora o presente estudo detecte a infecção por CT em pacientes HPV positivas e com lesão cervical, este não determina a relação causa-efeito entre estes dois agentes nas pacientes estudadas. Porém, evidências epidemiológicas apontam fortemente para o papel do HPV e da CT na etiologia da neoplasia intraepitelial cervical e subsequente desenvolvimento do câncer de colo de útero, além dos danos resultantes da infecção provocada por cada um destes agentes no organismo, considerados DST (TAMIM et al., 2002).

As DST são consideradas problemas de saúde pública há anos. As informações relacionadas à sua frequência são de suma importância, principalmente por CT ainda não ser uma doença de notificação compulsória no Brasil. A qualificação de programas de controle e prevenção de DST quanto ao diagnóstico de CT, programas de educação e atenção primária e desenvolvimento e larga distribuição de vacinas podem contribuir para redução deste grande problema de saúde pública, bem como redução do desenvolvimento de lesões de colo de útero, conforme as fortes evidências que associam esta bactéria como fator isolado ou cofator do HPV na neoplasia cervical (BECKER, 2005; IGANSI, 2005; PASSOS, 2007).

7. CONCLUSÃO

- Detectou-se, através da técnica de PCR, 26,8% de *Chlamydia trachomatis* em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na FCECON-AM, confirmando a eficiência da técnica utilizada.
- A frequência de co-infecção *C. trachomatis* e HPV foi de 27,5% e todas as pacientes CT-positivas eram também HPV-positivas. Pacientes HPV-negativas não apresentaram infecção por *Chlamydia trachomatis*.
- A faixa etária das pacientes estudadas foi dos 17 aos 73 anos, com predominância de idade entre 27 a 36 anos (38%), seguida de 37 aos 46 anos (29%). Das 41 pacientes com co-infecção *Chlamydia trachomatis* e HPV, a faixa etária predominante foi dos 17 aos 36 anos (23/41).
- O tipo de lesão predominante foi neoplasia intra-epitelial cervical III, frequente em 59% das pacientes com co-infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRING, L.; BRENTANO, J. E.; VARGAS, V. R. A. O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas .Guarani: estudo de revisão. **RBAC**, v.38, n.2, p. 87-90, 2006.

ALFAIA, A.P.B.B. Infecção por *Chlamydia trachomatis* em gestantes: Prevalência e Importância Pré-natal. 2005. **Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical)** ã Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus ã AM.

ANTILA, T.; SAIKKU, P.; KOSKELA, P.; BLOIGU, A.; DILLNER, J.; IKAHEIMO, I.; JELLUM, E.; LEHTINEN, M.; LENNER, P.; HAKULINEN, T.; NARVANEN, A.; PUKKALA, E.; THORESEN, S.; YOUNGMAN, L.; PAAVONEN, J. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and Risk for Development of Cervical Squamous Cell Carcinoma. **JAMA**, v.285, n.1, p. 47-51, 2001.

ARAÚJO, R.S.C. & GUIMARÃES, E.M.B. Estudo da Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* em Adolescentes e Jovens do Sexo Feminino no Distrito Sanitário Leste do Município de Goiânia: Prevalência e Fatores de Risco. **Rev Bras Ginecol Obstet**, n. 24, v. 7, p. 492-492, 2002.

BARROS, N.K.S.; ALVES, R.R.F.; CARNEIRO, M.A.S.; RABELO-SANTOS, S.H. O papel da associação das infecções por Papilomavirus humano e a

Chlamydia trachomatis no desenvolvimento do câncer cervical. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.2, p. 114-118, 2007.

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

BECKER, D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por reação em cadeia de polimerase. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90 p, 2005.

BLACK, M.C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clinical Microbiology**, Rev., v.10, n.1, p. 160-84, 1997.

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

BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p. 149-161, 2005.

CARVALHO, N. S.; ANGELI, R.; KRAJDEN, M. Prevalência dos agentes de Cervicite: Análise da literatura. **DST ñ J Bras Doenças Sex Transm**, Rev., v.16, n.4, p. 56-60, 2004.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F.X.; MUNOZ, N. Review: Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, n. 89, p. 191-199, 2002.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in Reportable Sexually Transmitted Diseases in the United States, 2003 ñ **National Data on Chlamydia, Gonorrhea and Syphilis, 2003**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats/trends2003.htm> Acesso em: 28/03/2008.

CORRÊA, G.J. Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres portadora de lesão-intraepitelial cervical e câncer invasor. 2005. **Dissertação (Mestrado em Doença Tropicais e Infecciosas)** ñ Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas, Universidade do Estado do Amazonas ñ UEA.

DELUCA, G.; MARIN, H.M.; SCHELOVER1, E.; CHAMORRO; E.M.; VICENTE, L.; ALBHOM, M.; ALONSO, J.M. Infeccion por *Chlamydia trachomatis* y Papilomavirus en mujeres con alteraciones citohistológicas de cuello uterino. **MEDICINA**, v. 66, n. 4, 2006.

EULETÉRIO, R.M.N.; EULETÉRIO JUNIOR, J.; GIRALDO, P.C.; MUNIZ, A.M.V. Cervicite por *Chlamydia trachomatis* em Mulheres Sexualmente Ativas

Atendidas em um Serviço Privado de Ginecologia na Cidade de Fortaleza. **RBAC**, vol. 39. p. 287-290, 2007.

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

FERREIRA DE PAULA, F.D.; FERNANDES, A.P.; CARMO, B.B.; VIEIRA, D.C.D.; DUTRA, M.S.; SANTOS, C.G.M.; SOUZA, M.C.M.; ANDRADE, T.C.A.; VAGO, A.R.; FERNANDES, P.A. Molecular Detection of *Chlamydia trachomatis* and HPV Infections in Cervical Samples With Normal and Abnormal Cytopathological Findings. **Diagnostic Cytopathology**, v. 35, n. 4, 2007.

FILHO, A. M.; REMUALDO, V. Biologia molecular aplicada ao diagnostico de doenças infecciosas. **Prática Hospitalar**, Ano IX. Nº 53. 2007.

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

FREITAS, N.S. L. Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres atendidas na clínica de

infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes, Manaus ã Amazonas. 2007.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) ã Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus ã AM.

FRIAS, M.C.A.A.; PEREIRA, C.F.A.; PINHEIRO, V.M.S.; PINHEIRO, M.S.; ROCHA, C.F. Frequência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. **DST ã J Bras Doenças Sex Transm**, v.13, n.3, p. 5-22, 2001.

Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas ã FCECON ã AM.
Registro Hospitalar do Câncer. Dados dos registros de base hospitalar.
Ano 2002.

GALVIN, S.R.; COHEN, M.S. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 33-42, 2004.

GIULIANO, A.R.; DENMAN, C.; ZAPIEN, J.G.; HENZE, J.L.N.; ORTEGA, L.; DJAMBAZOV, B.; GALAZ, E.M.B; HATCH, K. Design and results of the USA-Mexico Border Human Papillomavirus (HPV), Cervical Dysplasia, and *Chlamydia trachomatis* Study. **Pan Am J Public Health**, n. 9, vol. 3, 2001.

GOLIJOW, C. D.; ABBA, M. C.; MOURÓN, S. A.; LANGUES, R. B.; DULOUT, F. N.; SMITH, J. S. *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus

infections cervical disease in Argentine women. **Gynecologic Oncology**, v.96, p. 181-186, 2005.

GROSS, G.E.; BARRASSO, R. **Infecção por Papilomavírus Humano ã Atlas Clínico de HPV**; trad. Maria Alice Guimarães. Porto Alegre. Editora Artes Médicas Sul Ltda., p.431, 1999.

HAMMERSCHLAG, M. R., MD. The Intracellular Life of Chlamydiae. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 239-438, 2002.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Screening Group ã cervical research studies**. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php?lang=1> Acesso em: 05/10/2007.

IGANSI, C.N.; Prevalência de Papilomavírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulher assintomática de Porto Alegre, Brasil. 2005. **Dissertação (Mestrado em Epidemiologia)**. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=140 Acesso em: 08/10/2005.

ISHAK, M. O. G.; ISHAK, R. O impacto da infecção por *Chlamydia* em populações indígenas da Amazônia brasileira. **Cad. Saúde Pública**, v.17, n.2, p. 385-396, 2001.

LOOMIS, W.P.; STARNBACH, M.N. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. **Current Opinion in Microbiology**, n.5 p.87-91, 2002.

MADELEINE, M.M.; ANTTILAS, T.; SCHWARTZ, S.M.; SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; CARTER, J.J.; WURSCHER, M.; JOHNSON, L.G.; GALLOWAY, D.A.; DALING, J.R. Risk of cervical cancer associated with *Chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. **International Union Against Cancer**, v. 120, p. 650-655, 2006.

MAHONY, J.B.; LUINSTRA, K.E.; SELLORS, J.W. et al. Comparison of plasmid and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.7, p. 1753-58, 1993.

MICHELON, J.; BOENO, A.; FILHO, E.V.C.; STEIBEL, G.; BERG, C.; TORRENS, M.C.T. Diagnóstico da infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 2, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Série F. Comunicação e Educação em Saúde. 2. ed. 2003.

MOLANO, M.; MEIJER, C.J.L.M.; SERVAAS, A.M.; POL, R.; BRULE, A.J.C. Combination of PCR Targeting the VD2 of omp1 and Reverse Line Blot Analysis for typing of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Serovars in Cervical Scrape Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2935-2939, 2004.

NAUCLER, P.; CHEN, H.C.; PERSSON, K.; YOU, S.L.; HSIEH, C.Y.; SUN, C.A.; DILLNER, J.; CHEN, C.J. Seroprevalence of human papillomaviruses and *Chlamydia trachomatis* and cervical cancer risk: nested case-control study. **Journal of General Virology**, v.88, p. 814-822, 2007.

NODA, M. F.; SÁNCHEZ, I. A.; OLIVEROS, S.Y.; KOURÍ, V.; CAPOTE, R.F.; SÁNCHEZ, L.M. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de exsudato endocervical por la reacción en cadena de la polimerasa. **Rev. Cubana Endocrinol**, v.13, n.2, p. 133-42, 2002.

OLIVEIRA, M.L.; AMORIM, M.M.R.; SOUZA, P.R.E.; ALBUQUERQUE, L.C.B.; BRANDÃO, L.A.C.; GUIMARÃES, R.L. Chlamydia Infection in Patients With and Without Cervical Intra-Epithelial Lesions Tested by Real-Time PCR vs. Direct Immunofluorescence. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 12, vol.4, p.324-328, 2008.

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

PASSOS, M.R.L. *Chlamydia trachomatis*: A Epidemia Silenciosa. **PHOENIX**. Ministério da Saúde. SPC-CNDST/Aids. Manual de controle de DST. 3ª ed. Brasília-DF, 2007. Disponível em: www.acemfc.org.br/modelo1/down/manual_controle_dst.pdf.

PONTES, I.M. Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos. 2003. 57f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** ã Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas/ Universidade Federal de São Carlos.

RAMOS, M.C.; BECKER, D.; GERMANY, C.; SANDER, M.A.; STEIN, A.; FAGUNDES, R.A.L.; FILGUEIRA, A.; CESTARI, T. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* por PCR em urina de mulheres residente em vila popular atendida por serviço de saúde comunitária em Porto Alegre, Brasil. **Doenças Sex Transm**, v.15, n. 2, p. 20-25, 2003.

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

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

SCHAEFFER, A.; HENRICH, B. Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* and Typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. **BMC Infectious Diseases**, n. 8, p. 56, 2008.

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

SCHIFFIMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; HILDESHEIM, A.; WACHOLDER, S.; RODRIGUEZ, A.C.; BRATTI, M.C.; SHERMA, M.E.; MORALES, J.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; WRIGHT, T.C.; SOLOMON, D.; CHEN, Z. SCHUSSLER, J.; CASTLE, P.E.; BURK, R.D. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, v. 337, p. 76-84, 2005.

SEADI, C. F.; OVAREC, R.; POSER, B.V.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 125-133, 2002.

SEADI, C. F.; OVAREC, R.; POSER, B.V.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L. Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase o in house no diagnóstico laboratorial da infecção por *C. trachomatis*. **DST ñ J bras Doenças Sex Transm**, v.15, n.4, p. 17-21, 2003.

SIMONETTI, A.C.; MELO, J.H.L.; SOUZA, P.R.E.; BRUNESKA, D.; LIMA FILHO, J.L. Immunological host profile for HPV and *Chlamydia trachomatis*, a cervical cancer cofactor. **Microbes and Infection**, n. 11, p. 435 e 442, 2009.

SINGLA, M.; BAL, B. Infectivity Assays For *Chlamydia Trachomatis*. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 2, n. 2, 2006. Disponível em: www.ispub.com/.../ijmb/vol2n2/chlamydia.xml Acesso em: 25/01/2009.

SMITH, J.S.; MUNOS, N.; HERRERO, R.; ELUF-NETO, J.; NGELANGEL, C.; FRANCESCHI, S.; BOSH, F.X.; WALBOOMERS, J.M.M.; PEELING, R.W. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines. **Journal of Infectious Diseases**, n. 185, p. 324-331, 2002.

SOLIMAN, P.T.; SLOMOVITZ, B.M.; WOLF, J.K. Mechanism of cervical cancer. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.1, n.2, p. 253-258, 2004.

STAGG, A.J. Vaccines against Chlamydia: approaches and progress. **MOLECULAR MEDICINE TODAY**, 1998.

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

WEINSTOCK, H. et al. Sexually transmitted diseases among American youth: Incidence and prevalence estimates, 2000. Perspectives on Sexual and Reproductive Health. v. 36, n. 1, p. 6-10, 2004. In: Trends in Reportable Sexually Transmitted Disease in the United States, 2005. **National Surveillance Data for *Chlamydia*, *Gonorrhea* and *Syphilis***, 2006.

WHARTON, J.T. & TORTOLERO-LUNA, G. Neoplasms of the Cervix. In: Bast, **Câncer Medicine**. 5th edição. Canada BCDecker inc., 2000. Disponível no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 05/12/2008.

WHO Regional Office for South-East Asia. **Women's Health In South-East Asia**. Jan. 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research & development**. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/documents/new_vaccines/en/index8.html . Acesso em: 05/12/2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (2003) **Hepatitis B Fact Sheet WHO/2004**. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact203.html>. Acesso em: 6/12/2008.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

ANEXO A ã PARECER DO CEP



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

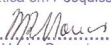


PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0188.0.115.000-07, intitulado: **“Importância do diagnóstico molecular no contexto das Doenças Sexualmente Transmissíveis”**, tendo como Pesquisadora Responsável Cristina Maria Borborema dos Santos.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 05 de julho de 2007.

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


.....
Profa Drª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora