

**JÚLIO MENTA DE ALMEIDA**

**COINFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E *Chlamydia trachomatis* OU  
*Gardnerella vaginalis* EM AMOSTRAS OBTIDAS POR AUTOCOLETA E COLETA  
CLÍNICA**

**CAMPO GRANDE**

**2015**



**JÚLIO MENTA DE ALMEIDA**

**COINFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E *Chlamydia trachomatis* OU  
*Gardnerella vaginalis* EM AMOSTRAS OBTIDAS POR AUTOCOLETA E COLETA  
CLÍNICA**

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do grau de mestre no curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Inês Aparecida Tozetti.

**CAMPO GRANDE**

**2015**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Inês Aparecida Tozetti, pela orientação e conselhos em cada etapa do meu mestrado. Por cada bronca e aviso, que me fizeram crescer e me lapidar, para me tornar um profissional melhor. Além disso, agradeço principalmente pela paciência e tempo que dispôs para o meu amadurecimento.

Gostaria de agradecer a minha mãe pelo apoio, amor, paciência, compreensão e ajuda em cada fase e texto que tive durante o mestrado. Agradeço ainda, por cada correção de gramática e no auxílio do sentido de cada frase.

Agradeço a minha irmã por me ajudar a relaxar nos momentos mais tensos da madrugada, e, pela paciência e ajuda na conferência de cada referência que usei.

Gustavo se cheguei até aqui boa parte foi pelo apoio e compreensão que teve comigo. Obrigado por tudo, inclusive as broncas que me ajudaram a manter o foco e não pitar nessa fase da minha vida. Que esta seja o fim de uma etapa, mas também o começo de uma nova fase.

Karlinha e Mari, obrigado pelo companheirismo e amizade, mas principalmente por me aturar no laboratório e nos emails, além de me ajudar com as várias correções de português.

Gabi, obrigado por tudo, principalmente aqueles domingos e madrugadas que vinha me ajudar por estar entediada ou apenas por que queria o meu bem.

Anaa, obrigado pela amizade e principalmente por me ajudar e auxiliar em tantos momentos nesse mestrado. Além disso, quero agradecer cada conselho que me deu durante esses dois anos de companhia.

Prof. Alda, obrigado imensamente por tudo, desde os conselhos às brincadeiras. Obrigado por me lembrar da beleza de trabalhar com o que gosta e da diversão de aprender uma nova técnica. Espero que ainda tenhamos alguns anos para nos divertir no laboratório e no paulistão.

Obrigado Lari, Camilinha, Cynthia e Carol, bem como ao Tiago, Felipe, Fabíola e Leandro, pela amizade e cada bom momento que tive na Imuno.

Agradeço a prof. Cacilda Padovani e ao prof. Carlos Eurico, pela contribuição nas várias etapas da elaboração da minha dissertação, bem como as correções durante a qualificação.

A todos os meus amigos do mestrado, principalmente ao Tulio (quer dizer Thiago), Babi, Juh, Jaque, Marco e Pamela, obrigado pelas risadas, dicas, explicações e rodízios de sushi.

Um agradecimento especial: ao meu pai por todo apoio que me deu durante a vida inteira; aos meus avós pelas palavras de força e confiança que sempre me deram; E aos meus padrinhos que mesmo longe me ajudaram a chegar onde estou.

Agradeço especialmente a Karla Campos, sem a qual não haveria este estudo. Agradeço cada amostra e questionário obtido.

E por fim, agradeço aos órgãos de fomento CNPq e Fundect, a UFMS e CAPES pela bolsa e apoio nesta pesquisa.

## RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é considerado o agente etiológico da infecção sexualmente transmissível mais frequente e está diretamente relacionado com o câncer cervical. Somente a infecção viral não é suficiente para a progressão neoplásica, outros fatores associados podem influenciar nesse mecanismo, tais como, a infecção por mais de um tipo viral e coinfeções por outros micro-organismos. Dentre os agentes infecciosos que podem associar-se ao HPV, destacam-se as bactérias *G. vaginalis* e *C. trachomatis* que podem favorecer a infecção e a persistência desse vírus. Entretanto, a detecção simultânea desses micro-organismos não é rotineira e poderia ser facilitada pela obtenção de uma única amostra autocoletada. O objetivo deste estudo foi detectar a coinfeção por HPV e *Chlamydia trachomatis* ou *Gardnerella vaginalis* em amostras de cérvix uterina, obtidas por autocoleta e coleta clínica e avaliar a eficiência do método de autocoleta na detecção destes micro-organismos. Foram analisadas amostras de 91 pacientes que se submeteram a duas intervenções para obtenção de células da endocérvice e canal vaginal para detecção de DNA de HPV. Tais amostras foram divididas em dois grupos, sendo 46 pacientes positivas para DNA de HPV em pelo menos um dos métodos de coleta e 45 pacientes negativas em ambos os métodos de coleta. A detecção do DNA de *C. trachomatis* e *G. vaginalis* foi avaliada por PCR multiplex. A frequência de DNA de *G. vaginalis* foi maior entre as amostras HPV positivas (78,4%), ocorrendo associação estatística entre a presença de DNA destes micro-organismos em ambos os métodos de coleta avaliados. Não foi possível avaliar a associação entre a infecção por HPV e a presença de DNA de *C. trachomatis* devido à baixa positividade encontrada para esta bactéria. Porém, todas as pacientes positivas para DNA de *C. trachomatis* também foram positivas para DNA de HPV e de *G. vaginalis*. Houve associação entre a presença de tipos virais de baixo risco oncogênico (LR-HPV) e DNA de *G. vaginalis* nas amostras obtidas por coleta clínica. Enquanto que, em relação aos tipos de alto risco oncogênico (HR-HPV) observou-se associação quanto à presença de DNA de *G. vaginalis* entre as amostras obtidas por autocoleta.

**Palavras chave:** Papilomavírus humano; Coinfeção; Autocoleta.



## ABSTRACT

The Human papillomavirus (HPV) is considered the most common etiologic agent of sexually transmitted infection and is directly related to cervical cancer. Only the viral infection isn't sufficient for neoplastic progression, other associated factors can influence, such as infection by more than one viral type and confections with other microorganisms. Among the microorganism that can be associated with HPV, we highlight *G. vaginalis* and *C. trachomatis* bacteria, which can promote infection and virus persistence. However, the simultaneous detection of these microorganisms is not routinely and could be facilitated by obtaining a single self-collected sample. The aim of this study was detected confections with HPV and *Chlamydia trachomatis* or *Gardnerella vaginalis* in samples of uterine cervix, obtained by self and clinician-collection. Were analyzed samples from 91 patients who were submitted to two interventions to obtain endocervical and vaginal cells for HPV DNA detection. These samples were divided into two groups, 46 patients positive for HPV DNA in at least one of the methods of collection and 45 patients negative in both collection methods. The detection of *C. trachomatis* and *G. vaginalis* DNA was evaluated by multiplex PCR. The frequency of *G. vaginalis* DNA was higher among HPV-positive samples (78.4%) with statistical association between the presences of DNA in both collection methods evaluated. It was not possible to evaluate the association between HPV infection and the presence of *C. trachomatis* DNA due to low positivity found for this bacterium. However, all patients positive for *C. trachomatis* DNA were also positive for HPV and *G. vaginalis* DNA. There was an association between the presence of low oncogenic risk types (LR-HPV) and *G. vaginalis* DNA from samples obtained by clinician-collection. While in the types of high-risk oncogenic (HR-HPV), was observed an association with the presence of *G. vaginalis* DNA from self-collection samples.

**Keywords:** Human papillomavirus; Coinfection; Self-collected samples.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Coinfecção HPV e <i>G. vaginalis</i> , segundo a presença de DNA de HPV e o método de obtenção das amostras, Campo Grande, MS – 2012.....	48
<b>Tabela 2</b>	Coinfecção HPV e <i>G. vaginalis</i> segundo a oncogenicidade, infecções múltiplas, tipos virais e o método de obtenção das amostras, Campo Grande, MS - 2012.....	49
<b>Tabela 3</b>	Concordância entre o resultado da bacterioscopia e a positividade para DNA de <i>G. vaginalis</i> segundo o método de coleta, Campo Grande, MS – 2012.....	50
<b>Tabela 4</b>	Positividade para DNA de <i>C. trachomatis</i> , segundo o método de coleta, a presença de DNA de HPV, tipos virais e DNA de <i>G. vaginalis</i> , em Campo Grande, MS - 2012.....	51



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Árvore filogenética segundo a região L1 de 118 tipos de Papilomavírus.....	25
<b>Figura 2</b>	Árvore filogenética segundo as regiões E1, E2, L1 e L2 de 132 tipos de Papilomavírus humano.....	26
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do genoma circular do HPV.....	27
<b>Figura 4</b>	Genes do HPV e suas respectivas funções.....	28
<b>Figura 5</b>	Estimativa da incidência de câncer de colo do útero, por 100 mil mulheres, em 2014.....	31
<b>Figura 6</b>	Prevalência do HPV em mulheres com citologia normal.....	32
<b>Figura 7</b>	Condições/ciclo empregado para cada tipo viral estudado.....	42
<b>Figura 8</b>	Perfil de restrição do HPV32 em amostra obtida por autocoleta e coleta clínica, Campo Grande, MS - 2012.....	45
<b>Figura 9</b>	Distribuição dos tipos virais entre as amostras genotipadas, positivas para HPV (n=61), obtidas por coleta clínica e autocoleta, em Campo Grande, MS - 2012.....	46
<b>Figura 10</b>	Resultado de PCR Multiplex para detecção de DNA de <i>G. vaginalis</i> e <i>C. trachomatis</i> , em amostras de autocoleta e coleta clínica, Campo Grande, MS - 2012.....	47



## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
HPV	Papilomavírus humano
PV	Papilomavírus
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TS-PCR	PCR tipo específico
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
qPCR	PCR em tempo real
LCR	Reação em cadeia da Ligase
HC	Captura Híbrida
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
E	Early (região precoce)
L	Late (região tardia)
P53	Proteína P53
PRb	Proteína do retinoblastoma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
pM	Picomol
°C	Graus Celsius

U	Unidades
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
mM	Milimolar
T <sub>m</sub>	<i>Temperature melting</i>
F	<i>Primer foward</i>
R	<i>Primer reverse</i>
EDTA	Ácido etilenediaminotetrácetico
TBE	Tris, ácido bórico e EDTA
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
LR	<i>Oncogenic Low risk</i> (baixo risco oncogênico)
HR	<i>Oncogenic High risk</i> (alto risco oncogênico)
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
HSIL	Lesão intraepiteliaiil escamosa de alto grau
AC	Autocoleta
CC	Coleta clínica
VB	Vaginose Bacteriana
DIP	Doença inflamatória pélvica
LGV	Linfogranuloma venéreo
pb	Pares de base
LCR	<i>large control region</i>
URR	<i>upstream regulatory region</i> (região regulatória)
NK	<i>Natural killer</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1

Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
CTL	Linfócito T citotóxico
VLP	<i>Virus Like Particle</i> (Partículas Semelhantes à Vírus)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i>



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1 Histórico do Papilomavírus humano .....	23
2.2 Taxonomia do Papilomavírus .....	24
2.3 Estrutura do Papilomavírus humano .....	26
2.4 Ciclo infeccioso e patogênese .....	28
2.5 Resposta imune e imunoprofilaxia.....	29
2.6 Epidemiologia.....	30
2.7 Métodos de diagnóstico da infecção pelo Papilomavírus humano .....	32
2.8 Métodos de coleta de amostras da cérvix e canal vaginal.....	33
2.9 Coinfecções .....	34
2.9.1 Coinfecção por <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	34
2.9.2 Coinfecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	35
3. OBJETIVO .....	39
3.1 Objetivo geral .....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.1 Tipo e local do estudo .....	41
4.2 Obtenção das amostras.....	41
4.3 Genotipagem viral por TS-PCR .....	41
4.4 Genotipagem viral por RFLP .....	42
4.5 Identificação do DNA de <i>G. vaginalis</i> e <i>C. trachomatis</i> por PCR multiplex .....	43
4.6 Detecção do produto da PCR multiplex e TS-PCR .....	43
4.7 Detecção do produto da RFLP .....	43
4.8 Análise estatística .....	44
4.9 Considerações éticas .....	44
5 RESULTADOS .....	45
5.1 Genotipagem viral .....	45
5.2 Infecções múltiplas.....	46
5.3 Concordância entre os tipos virais considerando os métodos de obtenção das amostras .....	46
5.4 Coinfecção HPV e <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	47
5.5 Concordância entre a presença de DNA de <i>Gardnerella vaginalis</i> segundo os métodos de obtenção da amostra e de detecção do micro-organismo .....	50

5. 6 Positividade para DNA de <i>Gardnerella vaginalis</i> e variáveis sócio-epidemiológicas .....	50
5. 7 Coinfecção HPV e <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	50
6 DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS .....	63
ANEXO 1.....	79

## 1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano é considerado o agente etiológico da infecção sexualmente transmissível mais frequente e está diretamente relacionado com o câncer cervical. Somente a infecção viral não é suficiente para a progressão neoplásica, vários outros fatores associados podem influenciar nesse mecanismo, tais como, a infecção por mais de um tipo viral e coinfeções com outros micro-organismos.

Dentre os vários patógenos cuja associação com a infecção por HPV poderiam contribuir para a progressão neoplásica, a bactéria *Chlamydia trachomatis* destaca-se por causar diversas enfermidades como a doença inflamatória pélvica, linfogranuloma venéreo e o tracoma.

A resposta imunológica ocasionada pela infecção por *C. trachomatis* pode favorecer a persistência viral, ou ainda, através da resposta inflamatória gerada, induzir maior produção de espécies reativas de oxigênio, levando a danos celulares que facilitariam a integração do genoma viral.

Outra bactéria que em associação com a infecção por HPV poderia favorecer a progressão neoplásica é *Gardnerella vaginalis*, podendo ser encontrada em pequenas quantidades na microbiota vaginal. A frequência elevada deste micro-organismo ocasiona doenças como endometrite e corioamnionite, podendo levar também ao aborto prematuro.

A associação da infecção pelo HPV com *G. vaginalis* é considerada apenas nos casos em que esta bactéria encontra-se em abundância na microbiota, o que normalmente está relacionada a desequilíbrios na microbiota vaginal, em quadros de vaginose bacteriana. Em tais casos, observa-se maior taxa de infecção viral e persistência do HPV.

Apesar de a coinfeção com tais bactérias poder potencializar a infecção por HPV e a progressão neoplásica, sabe-se que a detecção simultânea destes micro-organismos não é rotineira e poderia ser facilitada pela obtenção de uma única amostra autocoletada.

Neste estudo, além de detectarmos a associação da infecção por HPV com as bactérias *G. vaginalis* e *C. trachomatis*, avaliamos a eficiência do método de autocoleta na obtenção de DNA para detecção simultânea dessas bactérias.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico do Papilomavírus humano

No século XIX, mais precisamente em 1867, Rudolf Virchow, considerado o pai da patologia moderna, descreveu como condiloma, lesões genitais com pequenas elevações na superfície, semelhante à couve-flor (ALVES, 2010; ORIEL, 1971; SANTOS, 2008).

No século seguinte, Ciuffo (1907) sugeriu que as verrugas eram causadas pela presença de “germes” invisíveis. Posteriormente Shope e Hurst (1933), observaram que a incubação do “germe” e o surgimento das lesões variavam de seis a doze dias, sendo que esta variação era originada principalmente das diferentes virulências entre as suspensões utilizadas para a infecção. Shope e Hurst (1933), em outro experimento também com coelhos, após observarem a produção de anticorpos e o desenvolvimento de imunidade a reinfecções, sugeriram que o agente etiológico dessas lesões era um vírus filtrável. Apesar dos estudos da época, a verdadeira causa dessas lesões só foi confirmada por Strauss *et al.* (1949), com observação das partículas virais, em microscópio eletrônico.

Com o avanço das pesquisas, Zur Hausen (1976) propôs a relação entre a presença do Papilomavírus humano (HPV) e o câncer genital em humanos. No mesmo ano, Gissman e Zur Hausen (1976) confirmaram a existência de diferentes tipos desse vírus. Na década seguinte, Gissman *et al.* (1983) evidenciaram a presença do HPV6 e HPV11 em condiloma acuminado e a presença de tipos distintos nos casos de carcinoma cervical. Em paralelo, Durst *et al.* (1983) isolaram de amostra de câncer invasivo um novo tipo de HPV, classificando-o como HPV16. No ano seguinte, Boshart *et al.* (1984) isolaram e classificaram o HPV18 a partir de biópsia de carcinoma cervical.

Apesar de descrita desde a década de 70, a compreensão da relação entre o HPV e o desenvolvimento neoplásico, apenas obteve consistência com os estudos de Dyson *et al.* (1989) e Scheffner *et al.* (1990). No primeiro estudo, os autores concluíram que o HPV16 era capaz de levar à inativação funcional da proteína celular pRb após interação com a proteína viral E7. No segundo estudo, os pesquisadores relataram a degradação da proteína celular p53 induzida pela proteína E6 produzida pelos HPV16 e 18. Posteriormente, Zur Hausen e de Villiers (1994), resumiram esta associação, descrevendo o HPV como um fator necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento neoplásico.

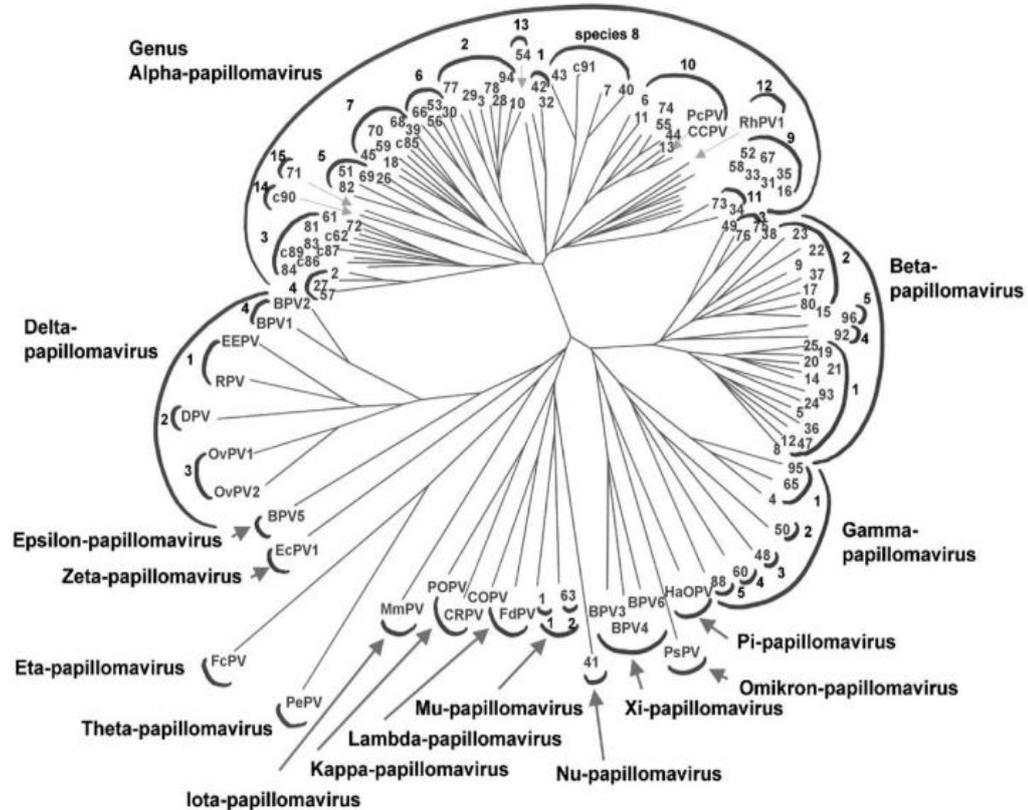
## 2.2 Taxonomia do Papilomavírus

Os Papilomavírus (PV) pertencem à família *Papillomaviridae*, a qual inclui 16 gêneros, sendo que cada gênero compartilha menos de 60% de identidade em relação ao gene L1, e variação relativa a toda sequência gênica entre 23% e 43% (de VILLIERS *et al.*, 2004). A árvore filogenética do PV está demonstrada na figura 1.

A classificação dos tipos virais segue as normas propostas por de Villiers *et al.* (2004). Para a classificação de um novo tipo viral, o genoma deve apresentar mais de 10% de diferença em relação ao gene L1, comparado aos tipos já descritos. Diferenças de 2% a 10% são atribuídas a subtipos e as diferenças inferiores a 2% são consideradas variantes.

Atribui-se ainda outras duas classificações ao HPV, de acordo com o seu tropismo, cutâneo ou mucoso e quanto à capacidade de induzir a transformação neoplásica da célula infectada em tipos de alto (HR-HPV) e baixo risco oncogênico (LR-HPV) (IARC, 2007).

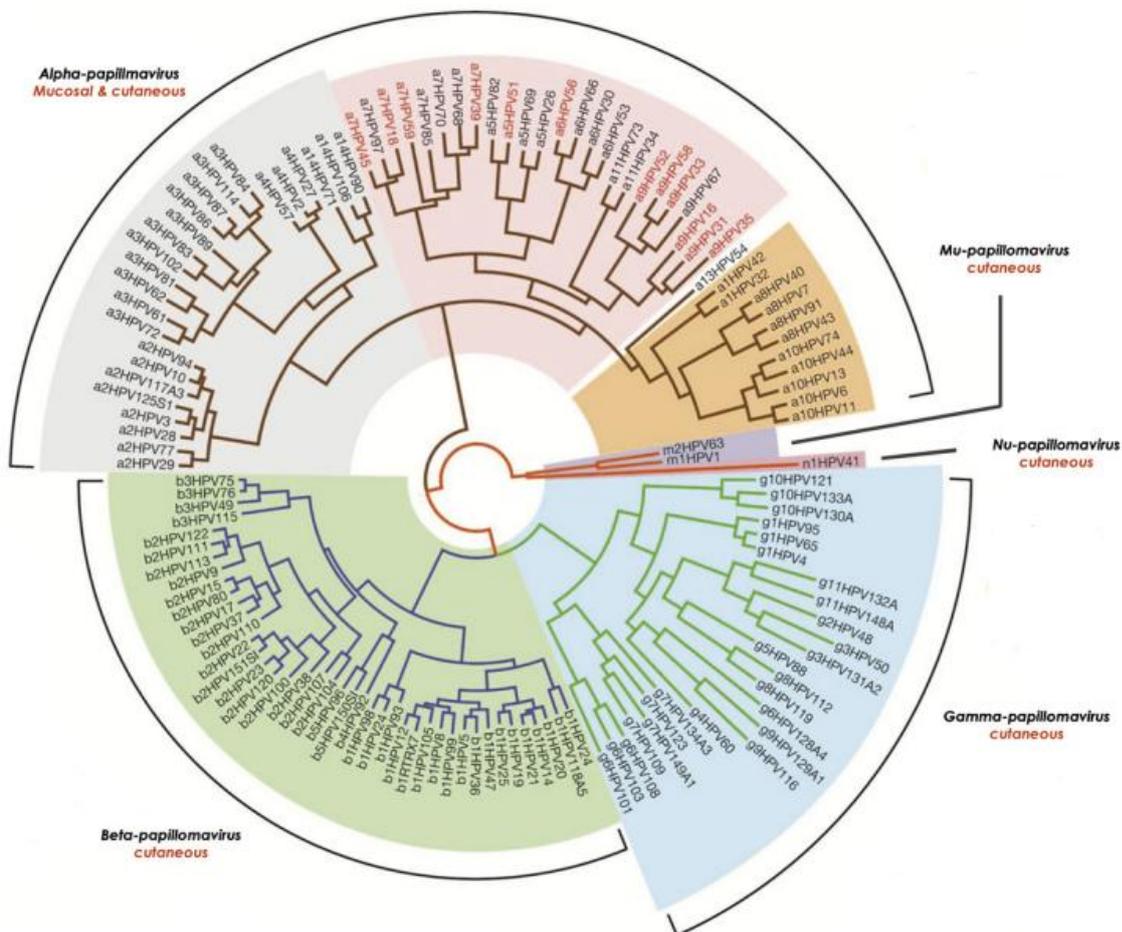
Figura 1 – Árvore filogenética segundo a região L1 de 118 tipos de Papilomavírus.



Fonte: de Villiers *et al.* (2004).

Dentre os 16 gêneros de PV, os Alpha-papillomavírus, Beta-papillomavírus, Gama-papillomavírus, Mu-papillomavírus e Nu-papillomavírus são capazes de infectar humanos e em sua maioria classificados como Papilomavírus humano (HPV). Os gêneros Beta-papillomavírus, Gama-papillomavírus e principalmente o Alpha-papillomavírus, são os responsáveis pelas lesões e progressões neoplásicas nas mucosas (DE VILLIERS *et al.*, 2004). A árvore filogenética destes gêneros do HPV está representada na figura 2.

Figura 2 – Árvore filogenética segundo as regiões E1, E2, L1 e L2 de 132 tipos de Papilomavírus humano.



Fonte: Modificado de Doorbar *et al.* (2012).

Até o momento foram identificados mais de 200 tipos, sendo cerca de 40 tipos relacionados a patologia do trato genital (BERNARD, 2005; BROOKS *et al.*, 2012; MORAES, 2008).

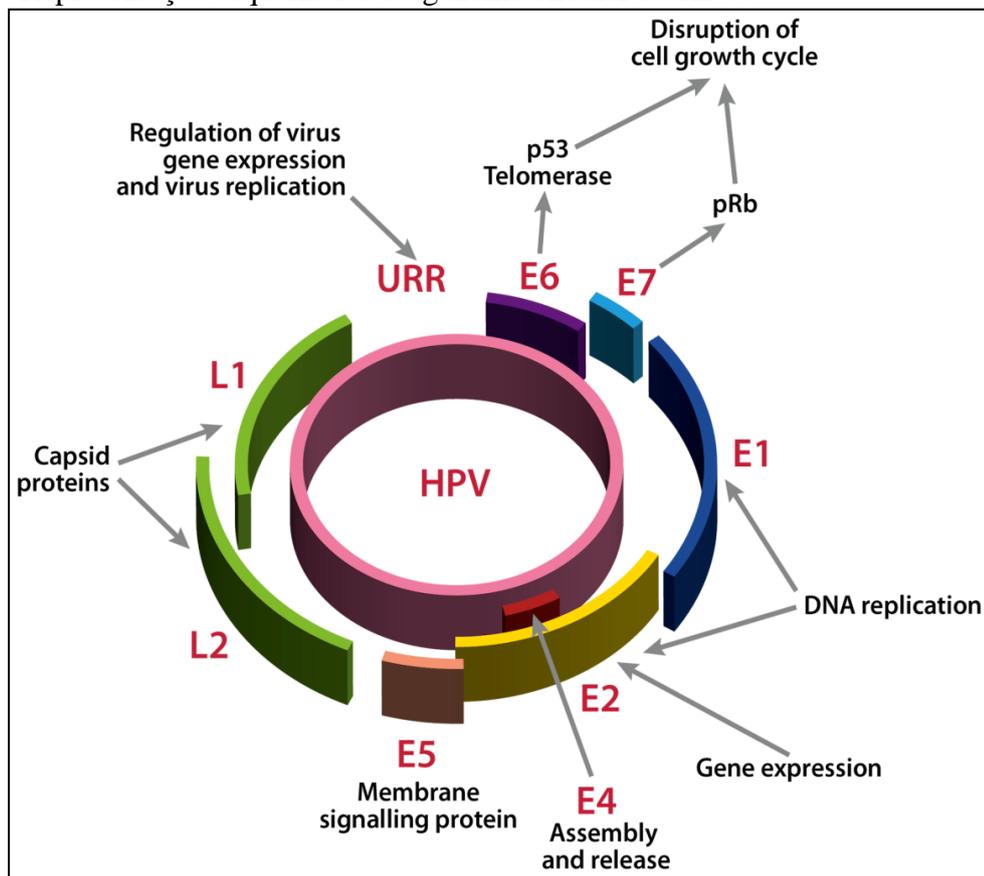
Aqueles com maior associação ao carcinoma cervical são classificados no grupo de alto risco oncogênico e compreendem principalmente os tipos: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 60, 66 e 68 (IARC, 2007; SANTOS, 2005; SARIAN, 2003; SEADI, 2006). Os considerados de baixo risco oncogênico, associados ao surgimento de condilomas acuminados, por exemplo, são representados principalmente pelos tipos: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 (CARVALHO, 2009; HALBE, 1993; IARC, 2007).

### 2.3 Estrutura do Papilomavírus humano

O HPV mantém as características de seu gênero, apresentando partículas com um tamanho de aproximadamente 55nm, simetria icosaédrica, ausência de envelope e capsídeo composto por 72 capsômeros. Apresenta um genoma de 6.800 a 8.400 pares de bases e peso molecular de  $5,2 \times 10^6$  daltons (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; TRISTAO *et al.*, 2012).

Seu genoma de DNA dupla hélice e circular (Figura 3) é dividido em três regiões, a primeira denominada de precoce ou *early* (45% do genoma total), a segunda descrita como tardia ou *late* (40% do genoma), ambas classificadas de acordo com sua ordem de expressão, a terceira região representando 15% do genoma, é responsável pelo controle da expressão gênica do vírus, denominada de região regulatória (URR) ou *large control region* (LCR) (OLIVEIRA, 2011; DOORBAR, 2005; SILVA, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do genoma circular do HPV.



Fonte: GenPath, 2012.

A primeira região é constituída pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, e está relacionada à replicação viral e propriedades oncogênicas. A segunda codifica as proteínas L1 e L2, constituintes do capsídeo viral (BROOKS *et al.*, 2012; MINOTTO, 2009; RONCAGLIA, 2012). A função dos genes das regiões E e L estão descritos na figura 4.

Figura 4 – Genes do HPV e suas respectivas funções.

Gene	Atividade gênica e função
E1	Importante na replicação e na transcrição viral. Possui atividade de DNA helicase.
E2	Regula os níveis de expressão dos genes virais (positivamente e negativamente). Recruta o gene E1 para a origem de replicação. Realiza a transferência do genoma viral para as células filhas durante o processo de divisão celular.
E4	Proteína mais expressa, entretanto, sem função elucidada. Tem sido associada aos processos de amplificação do DNA viral e sua liberação.
E5	Oncoproteína relacionada com a regulação para sinalização do fator de crescimento e evasão da resposta imunológica
E6	Oncoproteína supressora da apoptose celular, através da interação com a proteína p53.
E7	Oncoproteína capaz de se complexar com proteína pRb, inativando a função supressora de tumor.
L1 e L2	Responsáveis pela codificação das proteínas do capsídeo viral.

Fonte: IARC, 2007.

## 2.4 Ciclo infeccioso e patogênese

O ciclo infeccioso do HPV inicia-se nas células basais ou parabasais, após ter acesso a essas células através de microtraumas na superfície epitelial. Nestas células, o vírus internaliza-se por meio das proteínas L1 e L2 (DOORBAR, 2005; SAPP; DAY, 2009). Após a internalização, o genoma viral pode tornar-se integrado ou permanecer na forma episomal.

Na forma episomal ou reprodutiva, o DNA viral é mantido circular dentro da célula, multiplicando-se pela regulação do gene E2 e ação do gene E1, chegando a faixa de 50 a 100 cópias por célula. As células infectadas, então são estimuladas pela proteína E5, que leva a um aumento da divisão celular, onde o DNA viral é distribuído entre as células-filhas, que migram para a camada suprabasal entrando no processo de diferenciação. Posteriormente, os genes L1 e L2 são ativados, permitindo a montagem das partículas virais, e liberação para o meio extracelular, pelo processo de descamação do epitélio (BODILY; LAIMINS, 2011; DOORBAR, 2006; STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999).

Na forma integrada ou transformante, o DNA viral é linearizado e integrado no genoma da célula hospedeira. A quebra do DNA viral ocorre com maior frequência na região E2, levando à inativação do gene E2 o que induz a produção das oncoproteínas E6 e E7, as quais, na fase episomal são reguladas pelo gene E2. A produção dessas oncoproteínas, leva a

degradação das proteínas p53 e pRb, ambas supressoras de tumor, acarretando na imortalização das células infectadas, além de alterações no ciclo e na diferenciação celular (CANNIZZARO *et al.*, 1988; DYSON *et al.*, 1989; FEHRMANN; LAIMINS, 2003; SCHEFFNER *et al.*, 1990).

O HPV infecta o epitélio estratificado escamoso, onde pode permanecer em estado latente ou apresentar uma infecção ativa, a qual pode ser ainda subdividida em clínica e subclínica (BURD, 2003; DOORBAR, 2005; TYRING, 2000). Na infecção clínica, ocorre a formação de lesões únicas ou múltiplas, localizadas ou difusas e com tamanho variado. A infecção persistente por um mesmo tipo viral de alto risco oncogênico pode ocasionar a transformação neoplásica da célula infectada (BROOKS *et al.*, 2012; HINRICHSEN, 2005; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

## 2.5 Resposta imune e imunoprofilaxia

Aproximadamente 90% das infecções causadas pelo Papilomavírus humano regridem espontaneamente devido à participação do sistema imune. Mesmo quando a infecção é bem estabelecida e ocorre a formação de lesões, o sistema imune ainda pode induzir à remissão espontânea da infecção. Em cerca de 10% dos casos, a infecção pode persistir, resultando no agravamento das lesões cervicais e em aproximadamente 1% das mulheres infectadas, levar ao câncer cervical (STERN *et al.*, 2000; TINDLE; FRAZER, 1994).

Ambas as respostas, inata e adaptativa, são importantes para o *clearance* viral. O papel das células NK e dos macrófagos está associado ao controle da infecção nas fases iniciais. Na resposta adaptativa é evidenciada a produção de anticorpos, entretanto, estes surgem após seis meses ou mais, e não exercem caráter protetor. Os Linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) e suas citocinas, são essenciais para a eliminação viral, atuando em conjunto com os Linfócitos T Citotóxicos (CTL), para a eliminação viral (BHAT *et al.*, 2011; KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; STERN *et al.*, 2000; SCOTT; STITES; MOSCICKI, 1999).

A replicação com baixa carga viral e o ciclo não lítico são elementos que contribuem para evasão da resposta imune, inibindo a formação de ambiente inflamatório e reduzindo a apresentação antigênica (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; TINDLE; FRAZER, 1994).

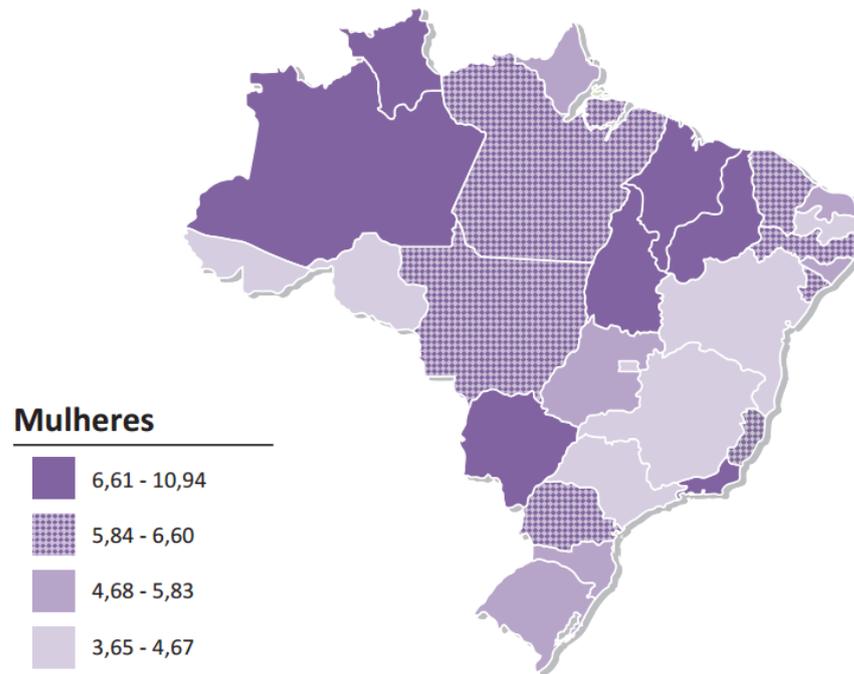
Quanto à imunoprofilaxia, duas vacinas estão disponíveis atualmente, a vacina bivalente (HPV16 e 18) Cervarix (GlaxoSmithKline Biologicals) e a quadrivalente (HPV6, 11, 16 e 18) Gardasil (Merck & Co.). Tais vacinas foram desenvolvidas através de métodos recombinantes, que utilizam a expressão da proteína L1 em diferentes vetores de expressão,

montadas nesses sistemas como partículas semelhantes a vírus (VLP). Recentemente, a empresa Merck & Co. anunciou a produção de uma nova vacina para os tipos HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (LOWY; SCHILLER, 1998; MUÑOZ *et al.*, 2004; SASLOW *et al.*, 2007).

## **2.6 Epidemiologia**

Aproximadamente 99% dos casos de carcinoma de cérvix uterina apresentam positividade para o DNA de HPV. Embora, apesar de ser o quarto mais diagnosticado no mundo, ainda é o segundo mais incidente entre mulheres de 15 a 44 anos e o quarto com o maior número de óbitos entre mulheres (ICO, 2014; JEMAL *et al.*, 2011; MUÑOZ, 2000; WALBOOMERS *et al.*, 1999). No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer cervical é considerado o terceiro mais incidente nas mulheres, com estimativas para o Brasil de 15 mil novos casos em 2014/2015 (INCA, 2014). A figura 5 demonstra a incidência estimada de câncer cervical para o ano de 2014.

Figura 5 – Estimativa da incidência de câncer de colo do útero no Brasil, por 100 mil mulheres, em 2014.

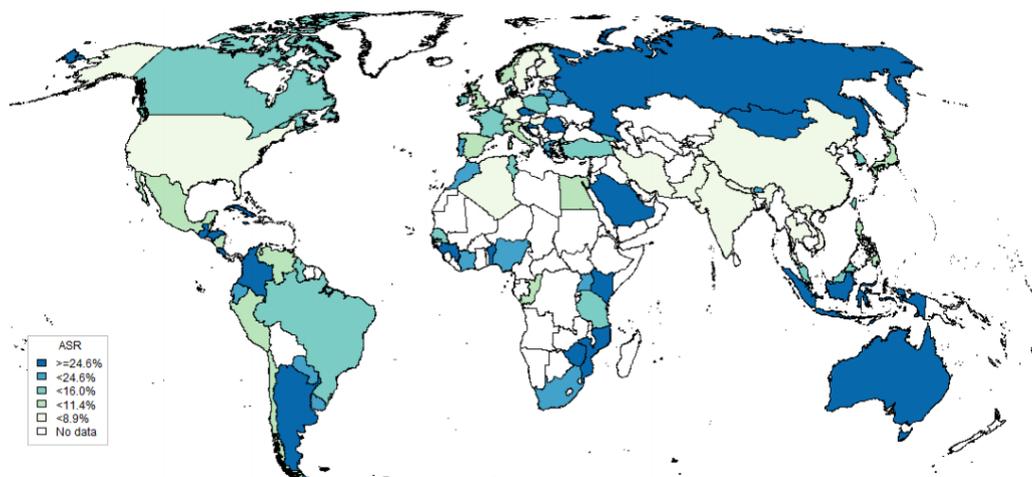


Fonte: INCA (2014).

A transmissão do HPV ocorre por contato pele/pele, pele/mucosa ou mucosa/mucosa, sendo a sua principal forma de transmissão o contato sexual, o que leva a infecção por este vírus ser considerada a infecção sexualmente transmissível (IST) mais frequente no mundo (FEDREZZI, 2011; IARC, 2012; PLETT-TORRES *et al.*, 2007; QUEIROZ; CANO; ZAIA, 2007).

A prevalência global de HPV em mulheres com citologia normal varia entre menor que 8,9% e igual ou maior a 24,5%, como demonstrado na figura 6.

Figura 6 – Prevalência do HPV em mulheres com citologia normal.



Fonte: ICO (2014).

No Brasil, a prevalência da infecção por HPV é de 14,1%, variando entre as regiões do país de 10,4% a 24,5% (AYRES; SILVA, 2010; WHO, 2010). Em Campo Grande (MS), estudos têm mostrado uma variação entre 28,9% a 30% na frequência da detecção de DNA de HPV em amostras de cérvix e canal vaginal (ALMEIDA *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2014).

## 2.7 Métodos de diagnóstico da infecção pelo Papilomavírus humano

Atualmente em nosso país, recomenda-se o exame citológico como triagem da infecção por HPV. Entretanto, por ser um método indireto, apresenta baixa sensibilidade, além de vários limitantes, tais como a necessidade de infraestrutura adequada, repetições em intervalos curtos de tempo e resultados subjetivos, o que leva à grande variação na qualidade (KITCHENER; CASTLE; COX, 2006; VILLA; DENNY, 2006).

A literatura apresenta diversas metodologias para detecção da infecção por HPV, dentre as técnicas disponíveis, as que permitem a detecção molecular ganham destaque por apresentarem sensibilidade e especificidade elevadas, uma vez que detectam a presença do DNA viral (VILLA; DENNY, 2006; SCHMITT, 2006).

Dentre as técnicas de detecção molecular disponíveis, as mais utilizadas para a detecção do HPV são: a Captura Híbrida (HC) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), esta última com variações mais sensíveis tais como a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) (GRAVITT *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2001; SCHMITT, 2006; SHIBATA; ARNHEIM; MARTIN, 1988; ZAMPIROLO; MERLIN; MENEZES, 2007).

As técnicas moleculares de um modo geral têm possibilitado não apenas a detecção do

DNA viral, mas também a genotipagem do HPV, o que permite determinar o tipo específico causador da infecção, sua oncogenicidade e distinguir as infecções com múltiplos tipos virais.

Para a detecção do HPV, as técnicas moleculares utilizam normalmente como alvo o gene L1, considerado o mais conservado no vírus. Para a genotipagem do HPV, são necessárias áreas com polimorfismo tipo específico, dentre essas destacam-se os genes E6 e E7, e com menor frequência o L1 (BRULE *et al.*, 1990; GRAVITT *et al.*, 2000; KARLSEN *et al.*, 1996; PITTA *et al.*, 2010).

Dentre as metodologias de genotipagem, a PCR tipo específica (TS-PCR) é uma alternativa útil, pois permite avaliar isoladamente cada tipo viral, facilitando a visualização de múltiplas infecções. A desvantagem desta técnica é a necessidade de várias reações para a genotipagem de um grupo viral de interesse (LIN *et al.*, 2008; SCHMITT, 2006).

A genotipagem por Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), por sua vez, é uma técnica que utiliza endonucleases para gerar padrões de digestão, permitindo a identificação de um amplo espectro de tipos em uma única reação. Entretanto seus resultados são de difícil interpretação em casos de infecções múltiplas. Para reduzir as desvantagens desta técnica, Nobre, Almeida e Martins (2008) propuseram um algoritmo de identificação utilizando as enzimas *Pst* I, *Hae* III, *Dde* I e *Rsa* I, que permite detectar mais de 49 genótipos de HPV (HUBBARD, 2003; NOBRE; ALMEIDA; MARTINS, 2008; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

## **2.8 Métodos de coleta de amostras da cérvix e canal vaginal**

O método de obtenção de amostra, considerado padrão ouro, para detecção do DNA do HPV, é a coleta clínica. Este método é realizado com o auxílio do espéculo, pelo profissional de saúde, o qual obtém amostra diretamente da cérvix uterina (PETIGNAT *et al.*, 2007; IGIDBASHIAN *et al.*, 2011).

Um método alternativo de obtenção de amostra é a autocoleta, que dispensa o uso do espéculo e permite que a paciente realize a coleta em sua própria casa. Este método tem demonstrado ser menos invasivo e mais aceito pela paciente, permitindo uma maior cobertura populacional e um menor custo para a paciente (CAETANO *et al.*, 2006; DZUBA *et al.*, 2002; PETIGNAT *et al.*, 2007; IGIDBASHIAN *et al.*, 2011).

Entretanto, comparada a coleta clínica, existe diferença quanto ao sítio de obtenção das amostras, pois a autocoleta obtém principalmente células do canal vaginal pela esfoliação, e em menor proporção da cérvix, pela descamação natural do epitélio (BHATLA *et al.*, 2009;

GRAVITT *et al.*, 2001; LAZCANO-PONCE *et al.*, 2011).

Vários estudos demonstram que a autocoleta é eficiente e apresenta resultados similares aos da coleta clínica, tornando-se uma alternativa favorável para os programas de rastreio (BHATLA *et al.*, 2009; KAHN *et al.*, 2005; PETIGNAT *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2014).

Apesar dos vários estudos, quanto à concordância entre estes métodos de coleta para a detecção do HPV, poucas pesquisas mostram a eficácia da autocoleta na detecção concomitante de outras bactérias associadas ao HPV.

## 2.9 Coinfecções

Pesquisas têm mostrado infecções associadas com HPV potencializando a infecção e aumentando o risco de câncer cervical, principalmente em relação a outras IST's e alguns micro-organismos presentes no trato vaginal (GILLET *et al.*, 2011; LIVENGOOD, 2009; MADELEINE *et al.*, 2007; MURTA *et al.*, 2000; ROETERS *et al.*, 2009; SANTO *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2004;).

Dentre os micro-organismos cuja associação com a infecção por HPV tem sido estudada, destacam-se as bactérias *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*, as quais tem sido associadas a infecção por HPV, potencializando a infecção por esse vírus e as chances de progressão neoplásica (DELUCA *et al.*, 2011; MADELEINE *et al.*, 2007; SANTO *et al.*, 2011).

### 2.9.1 Coinfecção por *Gardnerella vaginalis*

*Gardnerella vaginalis* é caracterizada como uma bactéria anaeróbica facultativa e imóvel, sem cápsula ou endósporos, com aproximadamente 2,0 µm de comprimento e 3,0 µm de diâmetro (CATLIN, 1992; MENEZES E SILVA; NEUFELD; SATO, 2006; NETO; BALDY, 1991).

Alguns autores consideram que a infecção por esta bactéria seja uma IST, devido principalmente a sua presença estar ligada a fatores de risco comuns a estas infecções, como por exemplo, multiplicidade de parceiros e o uso de preservativos. Apesar disso, na década de 80, a presença dessa bactéria deixou de ser considerada uma IST, por ser encontrada em pequenas quantidades no trato urogenital humano saudável, o que a caracteriza como um micro-organismo pertencente à microbiota vaginal (CATLIN, 1992; DANIELSSON;

TEIGEN; MOI, 2011).

A infecção pela *G. vaginalis*, em alguns casos, está relacionada com a ameaça de aborto prematuro e a doença inflamatória pélvica, bem como endometrite e corioamnionite. A principal relevância desta bactéria está associada ao seu papel na vaginose bacteriana.

A vaginose bacteriana (VB) é caracterizada por um aumento significativo na concentração da bactéria *G. vaginalis* e outros micro-organismos, como o *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis* e *Mobiluncus* spp. Concomitantemente, ocorre desequilíbrio da microbiota vaginal, aumento de pH, diminuição do número de lactobacilos e aumento da produção de sialidase, o que facilita a infecção por outros patógenos (GILLET *et al.*, 2011; LIVENGOOD, 2009; MARTIN, 2012; MENEZES E SILVA; NEUFELD; SATO, 2006; TATTI, 2010).

A associação da infecção pelo HPV com a infecção pela *G. vaginalis* é atribuída nos casos em que esta bactéria está presente em elevada quantidade na microbiota, em quadros de VB. Entretanto, a detecção de elevadas concentrações de *G. vaginalis* não é preditivo de VB, o que sugere, que infecção pela bactéria *G. vaginalis* isoladamente sem a presença de VB, pode estar associada a infecção por HPV. Reforçando esta ponderação, estudos moleculares têm mostrado que dentre todas as bactérias relacionadas à presença de VB, *G. vaginalis* é a mais relacionada à infecção por HPV (GAO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; MENARD *et al.*, 2008; NARDIS; MOSCA; MASTROMARINO, 2013).

A detecção da *G. vaginalis*, é normalmente realizada por bacterioscopia, considerada o teste padrão ouro, entretanto técnicas moleculares vêm se destacando principalmente devido a sua maior sensibilidade. Estudos do genoma desta bactéria são escassos e os principais alvos utilizados para a sua detecção molecular são os genes 16S rRNA e Cpn 60 (proteína *chaperonin* 60) (AROUTCHEVA *et al.*, 2001; DUMONCEAUX *et al.*, 2009; JÁYAPRAKASH; SCHELLENBERG; HILL, 2012; MENARD *et al.*, 2008; ZARIFFARD *et al.*, 2002).

### 2.9.2 Coinfecção por *Chlamydia trachomatis*

Pertencente ao gênero *Chlamydia*, são consideradas bactérias intracelulares obrigatórias de células eucariontes, com um ciclo de divisão bifásico próprio e característico de sua família (VAZ *et al.* 1999; WUNDER; CAJUEIRO, 2005; MENEZES E SILVA; NEUFELD; SATO, 2006).

*C. trachomatis* apresenta tamanho médio de 350 nm durante sua fase infectante (NETO; BALDY, 1991; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). No seu estado metabolicamente ativo, apresenta um tamanho médio de 900 nm, e uma membrana permeável e frágil (MURRAY ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

A infecção por *Chlamydia trachomatis* apresentou 101 milhões de novos casos em 2005, o que levou a ser considerada a infecção sexualmente transmissível curável, bacteriana, mais frequente no mundo. De acordo com a organização mundial de saúde, em 2008, houve um aumento para 105,7 milhões de novos casos a cada ano, tornando-se a segunda infecção sexualmente transmissível bacteriana mais frequente no mundo. Apesar do exposto, a prevalência desta bactéria varia consideravelmente, de 2,4% a 37,4% dependendo da população estudada (VARELLA *et al.* 2000; MIRANDA, 2003; SEADI *et al.*, 2002; WHO, 2008; WHO, 2011).

*C. trachomatis* é a principal responsável por doenças como: linfogranuloma venéreo (LGV), tracoma, conjuntivite de inclusão, pneumonia no recém-nascido, podendo ainda causar morte neonatal e parto prematuro (VARELLA *et al.* 2000; MIRANDA, 2003).

Nos homens, a bactéria é responsável por 30% a 50 % dos casos de uretrite não gonocócica, que se não tratada, pode levar à síndrome de Reiter. Em mulheres, a infecção genital por *Chlamydia trachomatis* leva à salpingite, cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade por oclusão tubária e gravidez ectópica, além de dor pélvica crônica. Em alguns casos manifestam-se sangramentos vaginais fora do período menstrual e após relações sexuais, além de disúrias e corrimentos vaginais (SEADI, *et al.*, 2002; COURA, 2005; MARCOLINO, *et al.*, 2008; POIARES *et al.*, 2008).

Estima-se que aproximadamente 76% das mulheres e 50% dos homens infectados apresentem-se assintomáticos. A infecção recorrente e o longo período assintomático da doença acarreta aos portadores desta bactéria alto risco para complicações relacionadas e possíveis infecções secundárias (SEADI *et al.*, 2002; MARCOLINO *et al.*, 2008; AMARAL, 2010).

São descritos mais de 15 sorotipos de *C. trachomatis*, sendo os sorotipos A, B, B<sub>a</sub> e C responsáveis pelo tracoma, enquanto que D, D<sub>a</sub>, E, F, G, H, I, I<sub>a</sub>, J, J<sub>a</sub> e K são associados a uretrite, endometrite, epididimite, proctite, conjuntivite, cervicite, salpingite, peri-hepatite e síndrome de Reiter. Os sorotipos L1, L2, L2<sub>a</sub> e L3 estão relacionados ao linfogranuloma venéreo. Os sorotipos cuja infecção está associada a infecção por HPV e ao carcinoma são os B, D, E, G, I e J (BLACK, 1997; ISHAK; ISHAK, 2001; SPAARGAREN *et al.*, 2005; MADELEINE *et al.*, 2007; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; FEITOSA, 2010).

O genoma da *C. trachomatis* é formado por um cromossomo circular com aproximadamente 1.000.0000 pb, responsável pela codificação de aproximadamente 800 proteínas, das quais, 70 são exclusivas da espécie. Além do cromossomo, a bactéria apresenta um plasmídeo de 7493 pb. Todos os plasmídeos sequenciados possuem menos de 1% de variância, portanto altamente conservados, com 8 regiões codificantes (BECKER, 2005; SEADI, 2006).

A natureza da associação entre a infecção por HPV e *C. trachomatis*, potencializa a transformação neoplásica e pode estar embasada na modulação da resposta imunológica. Estudos mostram que a infecção por essa bactéria estimula uma resposta celular (Th1), que está relacionada ao *clearance* da infecção. Porém, também é observado, em menor escala, uma resposta humoral (Th2). O desvio para Th2, normalmente está associado à infecção persistente desta bactéria. Esta modulação da resposta imune beneficia também, a infecção e persistência do HPV (BATTEIGER *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2004).

Por outro lado, a infecção por *C. trachomatis* induz a formação de ambiente inflamatório (Th1), e como consequência, temos a produção elevada de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem levar a danos celulares, o que facilitariam a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. Beneficiando, dessa forma, a infecção integrada ou transformante do vírus e aumentando o risco da progressão neoplásica. Estudos têm mostrado que o ambiente inflamatório crônico, induzido pela infecção por *C. trachomatis*, também está associado com a progressão neoplásica, por estimular a proliferação celular e a secreção de fatores pró angiogênicos e imunossupressores, contribuindo para o início da infecção pelo HPV e a progressão para o carcinoma (MADELEINE *et al.*, 2007; SANTO *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2011).

Reforçando a associação do HPV com esta bactéria, Madeleine *et al.* (2007) observaram diferenças quanto ao aumento do risco de progressão neoplásica de acordo com o sorotipo da *Chlamydia trachomatis* presente na infecção.

As técnicas utilizadas para detecção e identificação desta bactéria incluem: a visualização do micro-organismo por microscopia, por exemplo, esfregaço e coloração por Giemsa; detecção de anticorpos específicos, por imunofluorescência indireta, microimunofluorescência indireta e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA); detecção de ácidos nucleicos, por PCR e Reação em Cadeia de Ligase (LCR); ou ainda através de cultivo bacteriano.

Considerando a sensibilidade de algumas técnicas temos que, o exame de Papanicolaou, o qual evidencia por coloração este micro-organismo, tem uma sensibilidade de

apenas 62%, enquanto que as técnicas de culturas apresentam cerca de 80% de sensibilidade. Outras técnicas consideradas para o diagnóstico desta infecção são a Imunofluorescência e ELISA, ambas detectam anticorpos específicos, e a PCR, destacando esta última com sensibilidade de até 95% (SEADI, 2006; PEIXOTO, 2007; ROSSETTI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

Na PCR para detecção de DNA de *C. trachomatis*, dois alvos são os mais utilizados para a amplificação. O plasmídeo bacteriano e o gene *ompA* responsável pela síntese das proteínas de superfícies MOMP, que caracterizam os sorotipos da bactéria (BENI; MOTAMEDI; ARDAKANI, 2010; RODRIGUEZ *et al.*, 1991; ROSSETTI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

Considerando a importância e o impacto das coinfeções do HPV com bactérias como *G. vaginalis* e *C. trachomatis*, bem como as vantagens da autocoleta, na obtenção de DNA viável para a detecção simultânea desses micro-organismos, o presente estudo mostra-se de grande relevância, justificando a importância de detectar a associação desses agentes infecciosos, assim como avaliar a eficiência e concordância da autocoleta, comparada ao método padrão ouro de obtenção de amostras.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Detectar a coinfeção por Papilomavirus humano, *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis* em amostras obtidas por autocoleta e coleta clínica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Detectar e relacionar o DNA de *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis* com a presença de DNA de HPV, em amostras obtidas por autocoleta e coleta clínica.
2. Relacionar a frequência do DNA de *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis* com os principais tipos de HPV encontrados.
3. Estabelecer a concordância entre os métodos de coleta.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Tipo e local do estudo

O presente estudo foi de caráter transversal analítico, com amostras estratificadas por tipo de coleta. Esta pesquisa foi realizada na UFMS no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do CCBS/UFMS.

### 4.2 Obtenção das amostras

As amostras deste estudo foram originárias de 91 pacientes submetidas a duas intervenções, por autocoleta e por coleta clínica, para obtenção de células da endocérvice e canal vaginal na detecção de DNA de HPV. Tais amostras foram divididas em dois grupos, sendo 46 pacientes positivas para DNA de HPV em pelo menos um dos métodos de coleta e 45 pacientes negativas em ambos os métodos de coleta.

A detecção de DNA de HPV foi realizada em estudo anterior, deste grupo de pesquisa, por Campos *et al.* (2014) utilizando os *primers* PGMY09 e PGMY11 de acordo com metodologia descrita por Machado *et al.* (2014) adaptado de Gravitt *et al.* (2000).

Todos os resultados do exame bacterioscópico e dados sócio-epidemiológicos de cada paciente, bem como as amostras utilizadas, foram obtidos a partir do banco de amostras e dados da Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti, provenientes do estudo de Campos *et al.* (2014).

### 4.3 Genotipagem viral por TS-PCR

No presente estudo as pacientes positivas para DNA de HPV foram genotipadas inicialmente por TS-PCR, para os tipos, HPV11, 31 e 45. Os *primers* utilizados para o HPV11 e 31 apresentavam como alvo o gene L1, enquanto que os *primers* utilizados para o HPV45 tinha como alvo os genes E6/E7.

Todas as reações de TS-PCR apresentaram um passo inicial de desnaturação, por 10 minutos a 95 °C, e um passo final de extensão, por 5 minutos a 72 °C. Os ciclos utilizados foram adaptados dos artigos de origem de cada *primer*, e estão descritos na figura 7.

Figura 7 – Condições utilizadas para a detecção dos HPV 11, 31 e 45.

<b>Tipo viral</b>	<b>Condições utilizadas</b>	<b>Referências</b>
HPV11	40 ciclos de: 30 segundos a 95 °C; 30 segundos a 56 °C; 30 segundos a 72 °C.	Modificado de LIN <i>et al.</i> (2008)
HPV31	40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C; 40 segundos a 60 °C; 30 segundos a 72 °C.	Modificado de SWAN <i>et al.</i> (1999)
HPV45	10 ciclos de: 30 segundos a 94 °C; 30 segundos a 51 °C; 30 segundos a 72 °C. e 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C; 30 segundos a 46 °C; 30 segundos a 72 °C.	Modificado de KARLSEN <i>et al.</i> (1996)

Todas as TS-PCR foram executadas com 5 µL de amostra e Buffer 10x, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 10 mM de dNTPs, 10 pM de cada *primer* e 2,5 U de Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µL. O produto amplificado foi armazenado a -20 °C.

A genotipagem para os tipos HPV6, 16, 18 e 33, foi realizada no estudo anterior de Campos *et al.* (2014), de acordo com a metodologia de Silva *et al.* (2003) e Guo *et al.* (2007).

#### 4. 4 Genotipagem viral por RFLP

As amostras cujos tipos virais não foram determinados por TS-PCR, seja para os tipos do estudo anterior de Campos *et al.* (2014) ou os tipos do presente estudo, foram então submetidas a análise por RFLP. Para tanto as amostras que não possuíam produto ou apresentavam pequenas quantidades, foram reamplificadas com os primers PGMY09 e PGMY11 de acordo com protocolo descrito por Machado *et al.* (2014) e adaptado de Gravitt *et al.* (2000). A reação de RFLP foi realizada com as enzimas *Pst* I, *Hae* III, *Dde* I e *Rsa* I, de acordo com o proposto por Nobre, Almeida e Martins (2008).

#### 4. 5 Identificação do DNA de *G. vaginalis* e *C. trachomatis* por PCR multiplex

Para detecção de DNA de *G. vaginalis* e *C. trachomatis*, foram utilizados *primers* modificados e selecionados após análise *in silico*. Os *primers* selecionados para detecção de DNA de *G. vaginalis* foram: F-GV1M (5'-TACTGGTGTATCACTGTAAGGGCG-3') e R-GV3M (5'-CACAGGCTGAACAGTCAATCCC-3'), os quais apresentam como alvo, o gene 16S rRNA. Estes *primers* foram modificados de Zariffard *et al.* (2002).

Para detecção de DNA de *C. trachomatis* os *primers* selecionados foram: KL1M (5'-CGGAGCGAGTTACGAAGACAAA-3') e KL2M (5'-AATGCCCGGGATTGGTTG-3'), que apresentam como alvo um gene de uma proteína hipotética do plasmídeo bacteriano. Estes *primers* foram modificados de Mahony *et al.* (1992). O protocolo da PCR multiplex foi baseado nas reações propostas pelos autores dos *primers*.

A amplificação foi composta de uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, 53°C por 1 minuto para o anelamento e, 30 segundos a 72°C para extensão, seguido de uma extensão final por 5 minutos a 72°C.

Cada reação continha 5 µL de amostra e Buffer 10x, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 10 mM de dNTPs, 10 pM de cada *primer* e 2,5 U de Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µL. O produto gerado foi armazenado a -20 °C, para posterior análise.

#### 4. 6 Detecção do produto da PCR multiplex e TS-PCR

Os produtos obtidos a partir das reações, o controle positivo e o marcador de peso molecular de 100 pb foram homogeneizados separadamente em tampão de azul de bromofenol com sacarose, e então, aplicados em gel de agarose a 1,5%. A corrida foi realizada a 100 volts por 1 hora em tampão TBE 1x (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM, EDTA 2mM em H<sub>2</sub>O ultra pura).

Cada gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador e fotodocumentador da marca UVP, com auxílio do software Doc It-LS versão 7.1.

#### 4. 7 Detecção do produto da RFLP

O produto digerido, o controle sem digestão e marcadores de peso molecular de 100 pb e 50 pb, foram homogeneizados separadamente em tampão de azul bromofenol com

sacarose, e então aplicados em gel de agarose a 3%. A corrida foi realizada em 80 volts, por 1 hora e 30 minutos com tampão TBE 1x (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM, EDTA 2mM em H<sub>2</sub>O ultra pura).

O gel foi corado em brometo de etídio e visualizado em transiluminador e fotodocumentador da marca UVP, com auxílio do software Doc It-LS versão 7.1. Para leitura do perfil de restrição das amostras foi utilizado o algoritmo proposto por Nobre, Almeida e Martins (2008).

#### **4. 8 Análise estatística**

A tabulação e a análise dos dados foi realizada através do programa BioEstat versão 5.0 e do pacote estatístico SPSS, versão 10.0 (NORUSIS, 2000). As frequências foram analisadas pelo teste  $\chi^2$  de Pearson e a concordância entre os tipos de coleta foi avaliada pelo teste *Kappa*.

Para os dados sócio-epidemiológicos foi realizada análise multivariada, seguida de tabelas de contingência com o teste  $\chi^2$  de Pearson.

#### **4. 9 Considerações éticas**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (CEP/UFMS) no dia 8 de agosto de 2013, com protocolo n° 383.072 e CAAE 19253213.6.0000.0021 (Anexo 1).

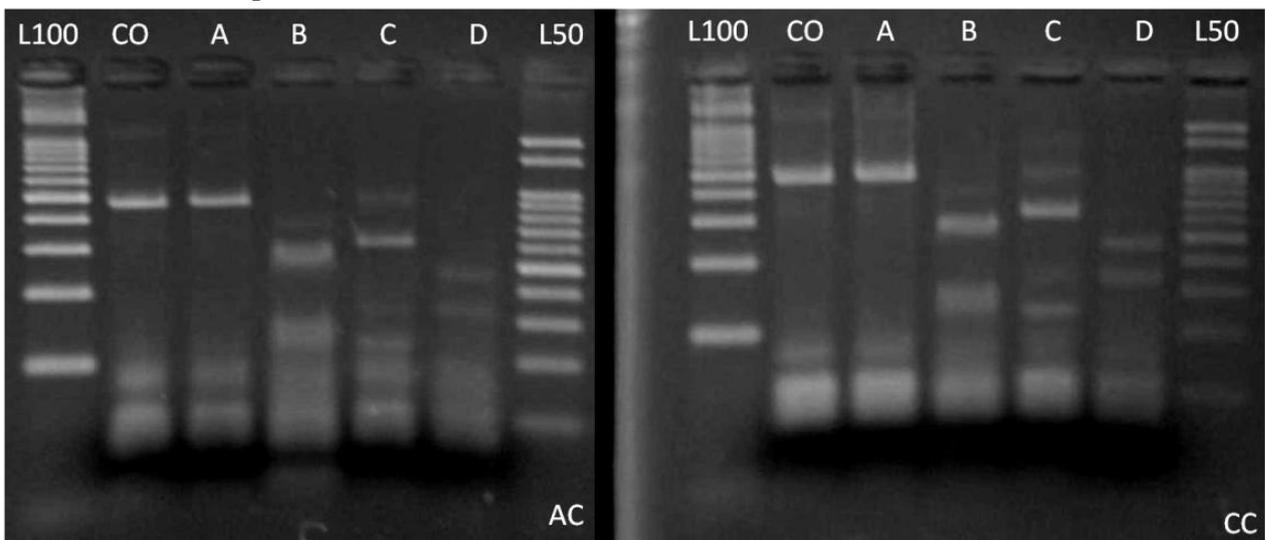
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Genotipagem viral

Considerando neste estudo as 46 pacientes positivas para DNA de HPV em pelo menos um dos métodos de coleta, temos que 61 amostras foram genotipadas, totalizando 35 pacientes, do total de 78 amostras provenientes de 46 pacientes estudadas. Sendo que 24% (11/46) das pacientes permaneceram com seus genótipos indeterminados.

Na figura 8 observamos o perfil RFLP do HPV32 em amostra obtida por autocoleta e coleta clínica.

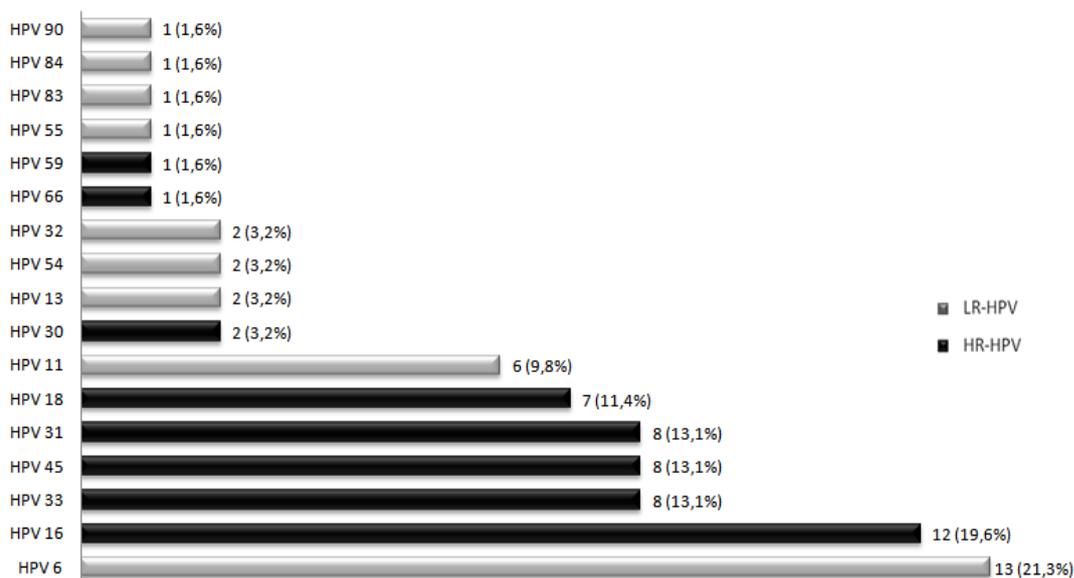
Figura 8 – Perfil de restrição do HPV32 em amostra obtida por autocoleta e coleta clínica, Campo Grande, MS - 2012.



Nota: L100: ladder de 100 pb; CO: controle sem digestão; A: digestão enzimática com *HaeIII*; B: digestão enzimática com *DdeI*; C: digestão enzimática com *RsaI*; D: digestão enzimática com *PstI*; L50: ladder de 50 pb. AC: amostra de autocoleta; CC: amostra de coleta clínica.

Os tipos de HR-HPV mais frequentes foram o HPV16 (19,6%), seguido pelos tipos 31, 33 e 45 (13,1%, cada) e HPV18 (11,4%). Quanto à genotipagem para LR-HPV, os mais frequentes foram o HPV6 (21,3%), HPV11 (9,8%), seguidos pelos tipos 13, 32 e 54 (3,2%, cada). Os tipos virais encontrados estão representados na figura 9.

Figura 9 – Distribuição dos tipos virais entre as amostras genotipadas, positivas para HPV (n=61), obtidas por coleta clínica e autocoleta, em Campo Grande, MS - 2012.



## 5. 2 Infecções múltiplas

Considerando as amostras genotipadas neste estudo e aquelas anteriormente avaliadas por Campos *et al.* (2014), 31,4% (11/35) apresentaram múltiplas infecções, ou seja infecção por mais de um tipo de HPV. Dentre essas, 82% (9/11) apresentaram infecção por pelo menos um tipo de alto risco oncogênico, sendo que 27% (3/11) das infecções múltiplas foram causadas apenas por HR-HPV.

## 5. 3 Concordância entre os tipos virais considerando os métodos de obtenção das amostras

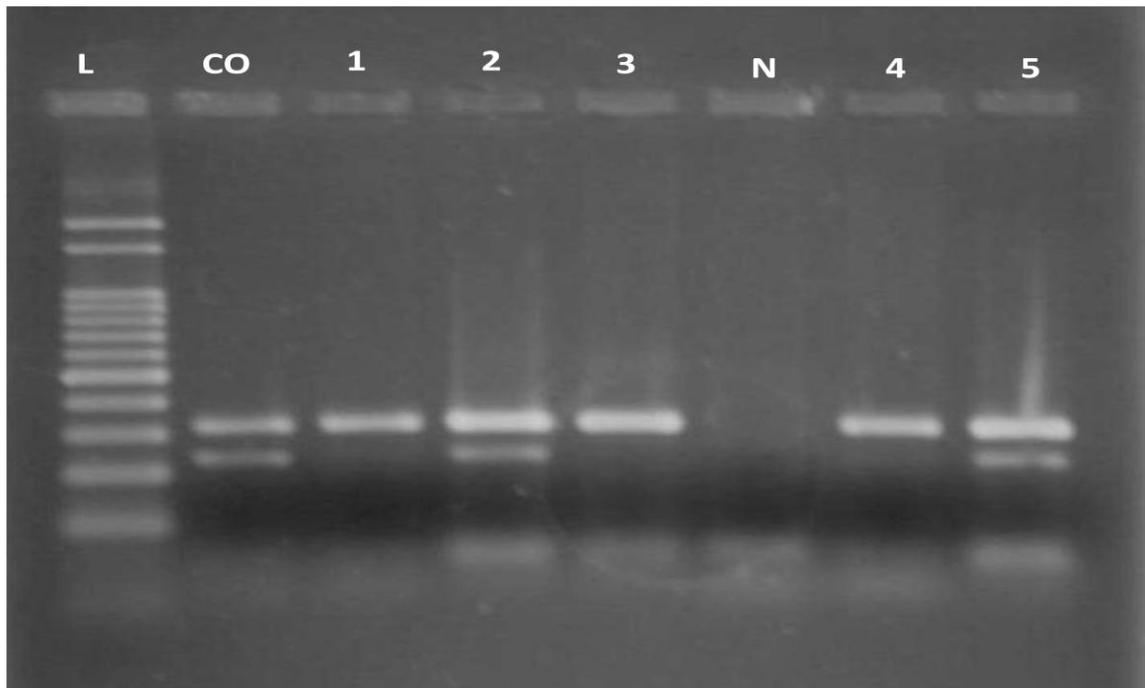
Considerando os resultados da genotipagem deste estudo e do estudo anterior, observamos concordância de 48,5% (k=0,39) entre os tipos virais detectados em ambos os métodos de coleta ( $X^2=55,219$ ;  $p=0,000$ ). Quando avaliamos a detecção somente dos tipos de alto risco oncogênico, a concordância encontrada foi de 76,2% ( $X^2=18,741$ ;  $p=0,000$ ;  $k=0,74$ ). Com relação à detecção de LR-HPV não foi observada concordância ( $p=0,41$ ).

Observou-se que 54,5% (6/11) das pacientes tiveram múltiplas infecções detectadas em ambos os métodos de coleta ( $X^2=28,102$ ;  $p=0,000$ ;  $k=0,90$ ).

#### 5. 4 Coinfecção HPV e *Gardnerella vaginalis*

Na figura 10 observamos a positividade de amostras obtidas por autocoleta e coleta clínica, quanto à presença de DNA de *G. vaginalis* e *C. trachomatis*.

Figura 10 – Resultado de PCR Multiplex para detecção de DNA de *G. vaginalis* e *C. trachomatis*, em amostras de autocoleta e coleta clínica, Campo Grande, MS - 2012.



Nota: L: ladder de 100 pb; CO: controle positivo; N: controle negativo; 1, 2 e 3: amostras de autocoleta; 4 e 5: amostras de coleta clínica; Banda superior ( $\cong 310$ pb): controle positivo para DNA de *G. vaginalis*; Banda inferior ( $\cong 240$ pb): controle positivo para DNA de *C. trachomatis*.

Os resultados quanto à positividade de *G. vaginalis* com a coinfecção com o HPV estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Coinfecção HPV e *G. vaginalis*, segundo a presença de DNA de HPV e o método de obtenção das amostras, Campo Grande, MS – 2012.

	Positividade para DNA de <i>G. vaginalis</i>		X <sup>2</sup>	p
	(n/total)	%		
Pacientes	65/91	71,4		
Pacientes HPV positivas (AC+CC)	36/46	78,4		
Pacientes HPV negativas (AC+CC)	30/45	66,6	0,989	0,320
Amostras HPV positivas AC	31/42	73,8		
Amostras HPV negativas AC	26/49	53,0	4,160	0,041
Amostras HPV positivas CC	27/36	75,0		
Amostras HPV negativas CC	26/55	47,2	6,878	0,009

Nota: AC: amostra de autocoleta; CC: amostra de coleta clínica; AC+CC: resultados de ambos os métodos de coleta.

Na tabela 2, observamos a coinfecção HPV e *G. vaginalis* de acordo com a oncogenicidade, os tipos virais e os métodos de obtenção das amostras.

Tabela 2 – Coinfecção HPV e *G. vaginalis* segundo a oncogenicidade, infecções múltiplas, tipos virais e o método de obtenção das amostras, Campo Grande, MS - 2012.

	Método de coleta	(n)	Positividade para DNA		X <sup>2</sup>	p
			de			
			<i>G. vaginalis</i>			
	(n)	%				
<b>HR-HPV</b>	AC	18	15	83,3	5,833	0,016
Pacientes n=21	CC	19	16	84,2	-	0,06
	AC + CC	21	18	85,7	-	0,44
<b>LR-HPV</b>	AC	13	10	76,9	-	0,71
Pacientes n=17	CC	13	10	76,9	9,977	0,002
	AC + CC	17	15	88,2	-	0,17
<b>Infecções múltiplas</b>	AC	6	5	83,3	-	0,75
Pacientes n=11	CC	8	7	87,5	-	0,17
	AC + CC	11	7	63,6	-	0,51
<b>HPV 16</b>	AC	6	4	66,6	-	-
Pacientes n=6	CC	6	4	66,6	-	-
	AC + CC	6	4	66,6	-	-
<b>HPV 18</b>	AC	3	2	66,6	-	-
Pacientes n=4	CC	4	3	75	-	-
	AC + CC	4	3	75	-	-
<b>HPV 6</b>	AC	7	6	85,7	-	-
Pacientes n=9	CC	6	5	83,3	-	-
	AC + CC	9	8	88,8	-	-
<b>HPV 11</b>	AC	2	1	50	-	-
Pacientes n=4	CC	4	2	50	-	-
	AC + CC	4	2	50	-	-

Nota: HR-HPV: Tipos de alto risco oncogênico; LR-HPV: Tipos de baixo risco oncogênico; AC: amostra de autocoleta; CC: amostra de coleta clínica; AC+CC: resultados de ambos os métodos de coleta.

Observamos associação significativa entre o resultado bacterioscópico positivo para presença de *G. vaginalis* e pacientes com infecção por múltiplos tipos de HPV ( $X^2=4,074$ ;  $p=0,044$ ). Também houve associação entre a presença de *G. vaginalis* no exame

bacterioscópico e a infecção pelos HPV6 e HPV18 ( $X^2=12,381$ ;  $p=0,000$  e  $X^2=3,851$ ;  $p=0,05$ , respectivamente).

### 5. 5 Concordância entre a presença de DNA de *Gardnerella vaginalis* segundo os métodos de obtenção da amostra e de detecção do micro-organismo

Observamos que houve concordância (67,7%) entre ambos os métodos de obtenção da amostra quanto à presença do DNA de *G. vaginalis* ( $X^2=22,529$ ;  $p=0,000$  e  $k=0,49$ ). Quanto à concordância entre a detecção do DNA de *G. vaginalis* e o resultado da bacterioscopia observamos que foi de 21,5%, ( $X^2=3,723$ ;  $p=0,05$  e  $k=0,10$ ). Na tabela 3 observamos a concordância entre o resultado da bacterioscopia e positividade para DNA de *G. vaginalis*, segundo o método de coleta das amostras.

Tabela 3 – Concordância entre o resultado da bacterioscopia e a positividade para DNA de *G. vaginalis* segundo o método de coleta, Campo Grande, MS – 2012.

	AC		CC		Ambos métodos	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%
Bacterioscopia positiva para <i>G. vaginalis</i> (n=14)	12 <sup>1</sup>	85,7	10	71,4	14 <sup>2</sup>	100,0
Bacterioscopia negativa para <i>G. vaginalis</i> (n=77)	45	58,4	43	55,8	51	66,2
Total de pacientes (n=91)	57	87,6	53	81,5	65	71,4

Nota: <sup>1</sup>( $p=0,05$ ;  $k=0,12$ ); <sup>2</sup>( $p=0,05$ ;  $k=0,10$ ); AC: amostra de autocoleta; CC: amostra de coleta clínica.

### 5. 6 Positividade para DNA de *Gardnerella vaginalis* e variáveis sócio-epidemiológicas

A média de idade entre as pacientes positivas para DNA de *G. vaginalis* foi de 34,5 anos, enquanto que entre as pacientes negativas para DNA de *G. vaginalis* foi de 31,4 anos. Não foi observada nenhuma associação estatística entre as variáveis sócio-epidemiológicas e a presença de DNA de *G. vaginalis*.

### 5. 7 Coinfecção HPV e *Chlamydia trachomatis*

Do total de 91 pacientes avaliadas para o DNA de *C. trachomatis*, duas foram positivas em ambos os métodos de coleta e apenas uma com amostra obtida por autocoleta. Na tabela 4 observamos os dados referentes às amostras positivas para DNA de *C.*

*trachomatis*, segundo o método de coleta, positividade para DNA de HPV e DNA de *G. vaginalis*.

Tabela 4 – Positividade para DNA de *C. trachomatis*, segundo o método de coleta, a presença de DNA de HPV, tipos virais e DNA de *G. vaginalis*, em Campo Grande, MS - 2012.

Paciente	Método de coleta	Positividade para DNA de <i>C. trachomatis</i>	Positividade para DNA de HPV	Tipos virais	Positividade para DNA de <i>G. vaginalis</i>
<b>Paciente 1</b>					
	AC	Sim	Sim	HPV 33	Sim
	CC	Sim	Sim	HPV 33	Sim
<b>Paciente 2</b>					
	AC	Sim	Não	Não	Sim
	CC	Sim	Sim	HPV 6 e HPV 11	Sim
<b>Paciente 3</b>					
	AC	Sim	Sim	Não identificado	Sim
	CC	Não	Não	Não	Não

Nota: AC: amostra de autocoleta; CC: amostra de coleta clínica.



## 6 DISCUSSÃO

A genotipagem do HPV permite avaliar o prognóstico da paciente, possibilitando métodos de acompanhamento mais eficazes e menos dispendiosos (LOWY *et al.*, 2008). A detecção e identificação dos genótipos do HPV está contemplada entre as diretrizes do Ministério da Saúde para 2015, com implantação prevista nos Laboratórios Centrais subsidiados pelo governo federal (BRASIL, 2014).

Existem várias técnicas disponíveis no mercado para a genotipagem viral, e de um modo geral, estas apresentam grandes variações entre os tipos virais detectáveis, além de diferenças na especificidade e sensibilidade, principalmente em se tratando de infecções múltiplas (HAMONT *et al.*, 2006; HWANG *et al.*, 2003; KLUG *et al.*, 2008; SANDRI *et al.*, 2006). Para contornar tais deficiências este estudo utilizou duas técnicas distintas de genotipagem, a RFLP e a TS-PCR.

A TS-PCR permite a identificação isoladamente de cada tipo avaliado, sem causar dúvidas na interpretação de casos de infecções múltiplas (ALMEIDA *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2008). A RFLP, por sua vez, tem a capacidade de detectar um amplo espectro de tipos virais em uma única reação, entretanto, seus resultados são de difícil interpretação em casos de infecções múltiplas (HUBBARD, 2003). Ambas as técnicas apresentam especificidade e sensibilidade elevadas, e são amplamente empregadas para a genotipagem do HPV (BOUDA *et al.*, 2000; KROUPIS *et al.*, 2006; LUNGU *et al.*, 1992; SVARE *et al.*, 2002).

Com o intuito de avaliarmos a coinfeção, objetivo primordial em nosso estudo, foi necessário complementar os resultados de Campos *et al.* (2014), quanto à genotipagem. Para tanto, avaliamos por TS-PCR a detecção dos tipos 11, 31 e 45, e também, ampliamos os resultados avaliando por RFLP, as amostras cujo tipo viral não foi determinado por TS-PCR.

Desta forma, foi possível observar que os tipos mais encontrados foram o HPV6 (21,3%), o HPV16 (19,6%), o HPV31, 33 e 45 (13,1%, cada), o HPV18 (11,4%) e o HPV11 (9,8%).

Muñoz *et al.* (2003), na Espanha e em oito países da América Latina, África e Ásia, encontraram em pacientes sem alterações citológicas, maior frequência dos HPV16, 18, 45, 31, 6, 58, 35 e 33. Os tipos 31 e 35 mais frequentes na América Latina do que em outras regiões. A revisão sistemática de Ayres e Silva (2010), no Brasil, indicou que o HPV16 é o tipo mais prevalente de alto risco e que o HPV18 é encontrado em menor frequência que outros tipos virais.

Machado *et al.* (2014), em amostras de cavidade oral de indivíduos do sexo masculino em Campo Grande (MS), Brasil, encontraram HPV6 e 11 como os tipos mais frequentes. Ainda nesta cidade, utilizando as mesmas técnicas de genotipagem deste estudo em amostras cervicais de mulheres jovens, Almeida *et al.* (2013), obtiveram maior prevalência dos tipos HPV16, 31 e 45. Tozetti *et al.* (2006), por sua vez, no mesmo local, em pacientes encaminhadas para diagnóstico ou acompanhamento, identificaram os tipos de alto risco oncogênico HPV66, HPV45, 18 e 16, e os de baixo risco HPV6 e HPV11 como os mais frequentes. Esta ampla variedade de tipos relatados em nosso estudo e nos demais aqui citados pode ser atribuída à diversidade das amostras utilizadas ou a diferentes populações estudadas.

A presença de infecção múltipla normalmente está relacionada a um pior prognóstico, levando em conta que estas pacientes apresentam maior risco de desenvolverem o câncer cervical (LEE *et al.*, 2003).

Cuschieri *et al.* (2004) encontraram 43,3% de múltiplas infecções em mulheres no Reino Unido, provenientes de programas de *screening* do câncer cervical. Enquanto que, Lee *et al.* (2003) encontraram apenas 9,1% de múltiplas infecções em mulheres na Coréia do Sul, com neoplasia cervical intraepitelial e carcinoma de células escamosas, e 0,5% em mulheres sem alterações citológicas. Clifford *et al.* (2005), em estudo multicêntrico, em mulheres com citologia normal provenientes de 11 países obtiveram: 8,3% de múltiplas infecções na Nigéria; 2,5% na Índia; 0,3-3,9% no Vietnã; 0,7-1,7% na Tailândia; 1,6% na Coréia; 4,2% na Colômbia; 6,5% na Argentina; 2,8% no Chile; 1,1% na Holanda; 0,9% na Itália e 0,4% na Espanha.

O estudo de Almeida *et al.* (2013), em Campo Grande (MS), Brasil, encontrou 25% das amostras com múltiplas infecções, analisando mulheres jovens sem indicação clínica de infecção. Já Tozetti *et al.* (2006), nesta mesma cidade, porém em pacientes encaminhadas para diagnóstico ou acompanhamento desta infecção, encontraram 26,8% de múltiplas infecções. Padovani (2013), por sua vez, também neste mesmo local, em biópsia de cérvix uterina, em Campo Grande, encontrou 17,9%. No presente estudo encontramos frequência maior que a relatada em estudos na região, com 31,4% das pacientes apresentando infecção múltipla.

As amostras do presente estudo foram provenientes de pacientes que procuraram aconselhamento médico, devido a queixas clínicas, contrastando com as de Almeida *et al.* (2013). Porém, quanto comparadas a de Tozetti *et al.* (2006), apresentaram maior frequência de múltiplas infecções, tal fato, poderia ser justificado por um maior desempenho dos testes utilizados para genotipagem. Em nosso estudo os *primers* utilizados na TS-PCR e a

metodologia da RFLP segundo Nobre, Almeida e Martins (2008), divergiam de Tozetti *et al.* (2006). Quando avaliados os resultados de Padovani (2013), pode-se atribuir a menor frequência de múltiplas infecções à natureza da amostra, biópsia de cérvix e, portanto, estarem envolvidos com elementos que poderiam interferir no resultado da análise.

A autocoleta é um método de obtenção de amostras que tem sido muito estudada e recomendada para a detecção de DNA HPV, o que pode ser justificado por ser menos invasivo, ter uma maior aceitação por parte da paciente, além de propiciar uma maior cobertura e menor custo, considerando os encargos decorrentes das ausências no trabalho para a paciente no caso da coleta clínica (CAETANO *et al.*, 2006; DZUBA *et al.*, 2002; PETIGNAT *et al.*, 2007; IGIDBASHIAN *et al.*, 2011). Apesar de a coleta clínica ser considerada o padrão ouro, para obtenção de amostras, vários estudos relatam que a autocoleta tem resultados equivalentes e concordantes quanto à detecção de DNA de HPV, representando uma alternativa valiosa (CAMPOS *et al.*, 2014; GRAVITT *et al.*, 2001;).

Neste estudo, buscamos avaliar a concordância entre estes métodos no que concerne à identificação dos tipos virais e a detecção de DNA de *Chlamydia trachomatis* e *Gardnerella vaginalis*. Com relação aos tipos virais detectados foi observado 48,5% ( $k=0,39$  e  $p=0,000$ ) de concordância, considerando ambos métodos de coleta. Quanto a presença de HR-HPV, observamos maior concordância 76,2% ( $k=0,74$  e  $p=0,000$ ), semelhante ao estudo de Gravitt *et al.* (2001), indicando que a autocoleta pode ser recomendada para a obtenção de amostras cujo objetivo é a detecção dos HR-HPV.

Petignat *et al.* (2007) encontraram concordância entre a autocoleta e a coleta clínica quanto à detecção de DNA de HPV ( $k=0,66$ ) e de HR-HPV ( $k=0,66$ ). Kahn *et al.* (2004), com amostras de mulheres jovens, também encontraram resultados satisfatórios com a autocoleta, observando pelo teste de McNemar que não existe diferença entre os tipos de HR-HPV nas coletas ( $p=0,41$ ). Bhatla *et al.* (2009) encontraram menos de 1% de variação entre ambos métodos de coleta para HR-HPV. Zhang *et al.* (2014), ao avaliarem a presença de HR-HPV no canal vaginal e na cérvix, descreveram alta concordância entre os métodos de autocoleta e coleta clínica, porém a carga viral encontrada nas amostras da cérvix foi mais de 5 vezes maior que nas amostras do canal vaginal.

Quanto aos LR-HPV não foi observada concordância entre os tipos detectados em ambos os métodos de coleta ( $p>0,05$ ), o que pode ser justificado pelo sítio de infecção, uma vez que o epitélio do canal vaginal é preferencialmente infectado por LR-HPV e durante a autocoleta as células obtidas são em maior número provenientes do canal vaginal (GRAVITT *et al.*, 2001; LAZCANO-PONCE *et al.*, 2011; RICHARDSON *et al.*, 2003; Zhang *et al.*,

2014). Belinson *et al.* (2010) observaram que as amostras obtidas por autocoleta, nem sempre apresentam as mesmas frequências e tipos virais que as obtidas por coleta clínica, e que quanto mais próximo da região da cérvix uterina for feita a obtenção das amostras mais fidedigno são os resultados obtidos.

Em similaridade, Gravitt *et al.* (2001) observaram maior frequência de LR-HPV na amostras obtidas por autocoleta, e uma menor concordância quando comparado com amostras obtidas por coleta clínica. Petignat *et al.* (2007) e Zhang *et al.* (2014) observaram, em ambos os estudos, que a detecção de tipos de baixo risco oncogênico ocorreu com maior frequência no canal vaginal.

Apesar da ausência de concordância entre as coletas para LR-HPV, enfatizamos a boa concordância para detecção dos HR-HPV, o que nos leva a real importância clínica do diagnóstico e acompanhamento das pacientes.

Já em relação à identificação de infecções por múltiplos tipos virais, o método de autocoleta para obtenção de amostra apresentou concordância de 54,5% ( $k=0,90$  e  $p<0,001$ ) em relação à coleta clínica. Este valor de *Kappa* (0,90) representa que para a detecção de múltiplas infecções, amostras obtidas por autocoleta apresentam resultados equivalentes ao método padrão ouro de obtenção de amostra. Tal resultado está em acordo com os estudos de Winer *et al.* (2007) e Gravitt *et al.* (2001) que também observaram concordância entre os métodos de coleta quanto a detecção de múltiplas infecções.

Apesar dos poucos estudos quanto à relação do HPV com outros patógenos, pesquisas têm mostrado que associações com outros micro-organismos potencializam a infecção, aumentando a probabilidade de câncer cervical, principalmente quando analisam-se outras IST's (MURTA *et al.*, 2000; ROETERS *et al.*, 2009; SANTO *et al.*, 2011). Dentre as bactérias cuja associação com o HPV pode causar esse efeito potencializador, destacam-se *Chlamydia trachomatis* e *Gardnerella vaginalis* (GILLET *et al.*, 2011; LIVENGOOD, 2009; MADELEINE *et al.*, 2007; SANTO *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2004).

A literatura diverge quanto à prevalência de *G. vaginalis* entre a população feminina, principalmente devido à sensibilidade dos métodos empregados para determinação da infecção. No presente estudo a positividade para DNA de *G. vaginalis* foi de 71,4%, encontrando-se entre o espectro relatado na literatura. Pois, considerando os métodos moleculares de identificação do micro-organismo, Shim *et al.* (2010) encontraram positividade de 88,1% para DNA de *G. vaginalis* em mulheres na Coreia com citologia normal. Backer *et al.* (2007), entretanto, observaram positividade de 68% para DNA de *G. vaginalis* em mulheres na Itália. Já o estudo de Schwebke, Flynn e Rivers (2013), relata uma

positividade de 53% para DNA de *G. vaginalis* em mulheres com citologia normal, enquanto que, mulheres com flora intermediária a positividade para DNA de *G. vaginalis* foi de 83,3%.

Quando observamos estudos que consideram a bacterioscopia ou citologia para visualização desta bactéria, Becker *et al.* (2011) analisando mulheres com citologia normal, em Porto Alegre (RS), Brasil, encontraram 15,6% de positividade para *G. vaginalis*. No estudo de Buffon, Civa e Matos (2006) também Porto Alegre (RS), Brasil, a positividade para *G. vaginalis* em mulheres com citologia normal foi de 15,6%, em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) foi de 25,6%, e em pacientes com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) foi de 34,3%. Demonstrando a associação das lesões possivelmente causadas pela infecção por HPV com esta bactéria e corroborando com o estudo de Murta *et al.* (2000) que relacionou a presença de *clue cells* e as lesões causadas pelo HPV.

Apesar de não encontrarmos associação entre a presença de DNA de HPV e DNA de *G. vaginalis* entre as amostras avaliadas, observa-se que a frequência de *G. vaginalis* foi 11,8% maior entre o grupo de pacientes positivas para DNA de HPV. A ausência de associação entre o HPV e a *G. vaginalis* em amostras obtidas pelos diferentes métodos de coleta pode ser justificada pelo fato de na coleta clínica, obtermos amostra da região da cérvice uterina, enquanto que na autocoleta obtém-se amostra principalmente do canal vaginal com algumas células que descamam da cérvice, o que nos leva a sítios diferentes para a infecção bacteriana.

Entre as pacientes negativas para DNA de HPV, o percentual elevado encontrado (66,6%) também é esperado, considerando que a detecção do DNA foi realizada por PCR *end point*, a qual não determinou a carga bacteriana, pois de acordo com alguns estudos, a presença desta bactéria na microbiota vaginal em pequenas quantidades ocorre e não é indicativa de processo patogênico (MENEZES; SILVA; NEUFELD, 2006; TATTI, 2010). Tal ocorrência também foi registrada pelo estudo de Mendoza *et al.* (2013), relatando 45,3% de positividade para *G. vaginalis*, pela técnica de Gram, em pacientes HPV negativas.

Quando consideramos os resultados separadamente das amostras obtidas por autocoleta e coleta clínica, observamos que ambos métodos de coleta apresentam associação entre a presença do DNA de HPV e a presença de DNA de *G. vaginalis*. Sendo que entre as amostras obtidas por autocoleta o grupo positivo para DNA de HPV apresentou 20,8% mais amostras positivas para DNA de *G. vaginalis*. Enquanto que, entre as amostras obtidas por coleta clínica o grupo positivo para DNA de HPV apresentou 27,8% mais amostras positivas para DNA de *G. vaginalis*.

Estes resultados reforçam os dados da literatura, mostrando que existe a associação entre a infecção por HPV e a presença da *G. vaginalis*, porém apenas quando consideramos o mesmo sítio de infecção.

A literatura mostra que os HR-HPV tem tropismo pelo epitélio da cérvix uterina, apesar de infectarem eficientemente outras regiões tais como, o canal vaginal. Enquanto que os LR-HPV tem maior tropismo pelo epitélio do canal vaginal, sendo normalmente encontrados em maior frequência neste sítio (BELINSON *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014). Apesar disso, no presente estudo foi observada a mesma frequência para os HR-HPV e LR-HPV nas amostras de ambos métodos de coletas.

A associação encontrada entre a presença dos HR-HPV e o DNA de *G. vaginalis*, apenas para amostras obtidas por autocoleta, e a relação entre a presença dos LR-HPV e o DNA de *G. vaginalis* apenas em coleta clínica, podem indicar que a infecção da *G. vaginalis* também facilita a infecção por HPV em outros sítios, além da cérvix uterina.

A presença da *G. vaginalis* também apresentou associação com a presença de infecção por múltiplos tipos de HPV, porém foi observada apenas em relação aos resultados do exame bacterioscópico.

O exame bacterioscópico é considerado o padrão ouro para detecção de *G. vaginalis* (NUGENT; KHOHN; HILLIER, 1991; SHA *et al.*, 2005), entretanto este exame apresenta uma sensibilidade baixa quando comparado a métodos moleculares (GUIMARARES-PERES *et al.*, 1999; LEIBOVITZ *et al.*, 1995). A baixa sensibilidade observada faz com que a detecção ocorra apenas em amostras com grandes quantidades de *G. vaginalis*. Isto pode indicar que a associação entre múltiplas infecções e a presença de *G. vaginalis* ocorra apenas quando esta bactéria encontra-se em número elevado no microambiente, e não apenas devido a sua presença.

Entre ambos métodos de coleta, observamos concordância para a presença de DNA de *G. vaginalis* de 67,7% ( $p < 0,001$  e  $k = 0,49$ ). Menard *et al.* (2012) também encontraram concordância entre as coletas, com um coeficiente de correlação de Spearman de 0,94 para *G. vaginalis*, estes autores observaram ainda, que a autocoleta apresenta *Kappa* de 0,903 para elevadas concentrações desta bactéria ( $\geq 10^9$  cópias/mL), indicando que o método de autocoleta pode ser mais eficiente em estudos quantitativos. Apesar disso, a autocoleta mostrou concordância, sugerindo que pode ser utilizada não apenas para obtenção de amostras para detecção de DNA de HPV, como também para detecção de DNA de outros microorganismos que podem estar associados com a infecção por este vírus. Porém, devido a escassez de estudos e ao *Kappa* (0,49) encontrado no presente estudo, mais pesquisas são

necessárias, para recomendar esta técnica de obtenção de amostras para o *screening* de outros patógenos associados ao HPV, no âmbito das Unidades de Saúde.

Quanto a concordância, entre o resultado da detecção molecular do DNA de *G. vaginalis*, e o resultado do exame bacterioscópico, observou-se apenas 21,5% ( $p=0,05$  e  $k=0,10$ ), o que justifica-se pelo fato de que os métodos moleculares apresentam sensibilidade superior ao exame bacterioscópico.

Apesar da baixa positividade para DNA de *C. trachomatis* encontrada no presente estudo (3,29%), observou-se que as três pacientes positivas também foram positivas para DNA de HPV e *G. vaginalis*, o que pode sugerir a associação entre a presença destes microorganismos. Entretanto, devido ao pequeno número de amostras, consideramos a necessidade de maiores estudos.

Quanto a associação entre a infecção por HPV e a presença de *C. trachomatis*, Deluca *et al.* (2011), encontraram por PCR em mulheres na Argentina, 26,4% de positividade para *C. trachomatis*, sendo maior entre as pacientes positivas para HPV 34,9% ( $p=0,007$ ). Igansi (2005), em Porto Alegre (RS), Brasil, entre mulheres assintomáticas, encontrou 12,6% de positividade para *C. trachomatis*, sendo 51% coinfectada com HPV. Mendoza *et al.* (2013), em estudo realizado no Paraguai, encontraram 9,9% de mulheres positivas para *C. trachomatis*, além de uma associação entre a presença de DNA de *C. trachomatis* e a infecção por HPV.

O estudo de Wiesenfeld *et al.* (2003) e o estudo de Joesoef *et al.* (1996) relataram forte associação entre *Chlamydia trachomatis* e vaginose bacteriana, o que pode indicar uma possível relação entre a presença de *C. trachomatis* e *G. vaginalis*.

A baixa positividade encontrada para DNA de *C. trachomatis*, no presente estudo, pode ser justificada pela utilização de *primers* modificados, o que levaria a alterações na sensibilidade e especificidade da reação de PCR (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993; WU *et al.*, 1991). Entretanto, a análise *in silico*, realizada no presente estudo, não evidenciou problemas significativos neste sentido.

Outra explicação para a baixa positividade no presente estudo pode ser devido ao alvo dos *primers* na reação de PCR para *C. trachomatis*, ser o plasmídeo, e não o DNA genômico. Desta forma, as pacientes infectadas com cepas circulantes sem plasmídeo não poderiam ser detectadas levando a resultados falsos negativos. Entretanto, as cepas com ausência de plasmídeo são raras e não representam significativamente as cepas circulantes (RIPA; NILSSON, 2007; ROSSETTI; SILVA; RODRIGUES, 2006; STOTHARD *et al.*, 1998).

O armazenamento das amostras por longos períodos de tempo pode ser outra justificativa para a baixa positividade, uma vez que poderia levar a degradação e perda quantitativa de DNA. Apesar disso, estudos mostram que mesmo após anos de armazenagem a -20 °C, as amostras ainda permanecem viáveis para a execução da técnica de PCR (FREEMAN *et al.*, 2003; JEROME *et al.*, 2002; MADISEN *et al.*, 1987).

A bactéria *Chlamydia trachomatis* é sensível a um amplo espectro de antibióticos (azitromicina, doxiciclina, tetraciclina, eritromicina, ofloxacina, rifampicina, sulfametoxazol e cefoxitina) (HALBE, 1993; MARQUES; MENEZES, 2005), no entanto não há registro entre os dados secundários avaliados, no presente estudo, sobre a utilização desses medicamentos por parte das pacientes, podendo também ser um fator interferente na detecção da bactéria. A baixa positividade para este micro-organismo encontrada pode ainda pode ser característica comum desta população. Como observado por Luppi *et al.* (2011), que encontraram em São Paulo 8,4% de positividade para *C. trachomatis*, por Brandão, Lacerda e Ximenes (2010) por meio de captura híbrida, que também encontraram 4,4% de positividade, e Botelho (2008) no estado de Mato Grosso do Sul, encontrou 7,39% de gestantes sororeativas para *C. trachomatis*.

No presente estudo relatamos a viabilidade das amostras obtidas por autocoleta para a detecção de patógenos, tais como a *G. vaginalis* e *C. trachomatis*, cuja associação a infecção por HPV está relacionada ao risco de progressão neoplásica. Também confirmamos dados anteriores que recomendam a autocoleta como um método de obtenção de amostra válido para a genotipagem do HPV.

## 7. CONCLUSÃO

A frequência de DNA de *G. vaginalis* foi maior entre as amostras HPV positivas, ocorrendo associação estatística entre a presença de DNA destes micro-organismos em ambos métodos de coleta avaliados.

Houve associação entre a presença de LR-HPV e DNA de *G. vaginalis*, entre as amostras obtidas por coleta clínica.

Em relação aos HR-HPV observou-se associação quanto à presença de DNA de *G. vaginalis* entre as amostras obtidas por autocoleta.

Observou-se concordância entre ambos os métodos de obtenção de amostras em relação à detecção de HR-HPV, infecções por múltiplos tipos virais e DNA de *G. vaginalis*.

Não foi possível avaliar a associação entre a presença de DNA de *C. trachomatis* e a infecção por HPV devido à baixa positividade encontrada para esta bactéria. Porém, todas as pacientes positivas para DNA de *C. trachomatis*, também foram positivas para DNA de HPV e de *G. vaginalis*.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. G.; MACHADO, A. P.; FERNANDES, C. E.; FERREIRA A. T.; PADOVANI, C. T. J.; TOZETTI, I. A. Molecular epidemiology of the human papillomavirus infection in self-collected samples from young women. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 2, p. 266–271, 2013.
- ALVES, D. B. **Identificação “in situ” de linfócitos t cd4, cd8 e células nk em cérvice uterina de pacientes infectadas pelo Papilomavírus humano em Campo Grande, MS.** 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- AMARAL, R. L. G. **O papel das duchas higiênicas vaginais sobre a prevalência das infecções genitais em mulheres profissionais do sexo.** 2010. 82 f. Tese (Doutorado em Tocoginecologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- AROUTCHEVA, A.; GARITI, D.; SIMON, M.; SHOTT, S.; FARO, J.; SIMOES, J. A.; GURGUIS, A.; FARO, S. Defense factors of vaginal lactobacilli. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 185, n. 2, p. 375-379, 2001.
- AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 5, p. 963-974, 2010.
- BACKER, E.; VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; ALQUMBER, M. A.; BURTON, J. P.; TAGG, J. R.; TEMMERMAN, M.; VANECHOUTTE, M. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus species*, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. **BioMedCentral Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 115, 2007.
- BATTEIGER, B. E.; XU, F.; JOHNSON, R. E.; REKART, M. L. Protective immunity to Chlamydia trachomatis genital infection: evidence from human studies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 2, p. 178-189, 2010.
- BECKER, D. **Detecção de Chlamydia trachomatis em amostras cervicais por reação em cadeia da polimerase.** 2005. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BECKER, D. L. BROCHIER, A. W.; VAZ, C. B.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, M. L. V.; PILGER, D. A. P.; CALIL, L.; FUENTEFRIA, A. M. Correlação entre infecções genitais e alterações citopatológicas cervicais em pacientes atendidas no sistema de saúde pública de Porto Alegre. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 23, n. 3, p. 116-119, 2011.
- BELINSON, J. L. HU, S.; NIYAZI, M.; PRETORIUS, R. G.; WANG, H.; WEN, C.; JENNIFER S. SMITH, J. S.; LI, J.; TADDEO, F. J.; BURCHETTE R. J.; QIAO, Y. Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: Implications for vaginal self-collection. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 5, p. 1151-1157, 2010.

BENI, B. T.; MOTAMEDI, H.; ARDAKANI, M. R. Genotyping of the prevalent *Chlamydia trachomatis* strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1023–1028, 2010.

BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 1, p. 1-6, 2005.

BHATLA, N.; DAR, L.; PATRO, A. R.; KUMAR, P.; KRIPLANI, A.; GULATI, A.; IYER, V. K.; MATHUR, S. R.; SREENIVAS, V.; SHAH, K. V.; GRAVITT, P. E. Can human papillomavirus DNA testing of self-collected vaginal samples compare with physician-collected cervical samples and cytology for cervical cancer screening in developing countries?. **Cancer epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 446-450, 2009.

BHAT, P.; MATTAROLLO, S. R.; GOSMANN, C.; FRAZER, I. H.; LEGGATT, G. R. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 85-98, 2011.

BLACK, C. M. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 160–184, 1997.

BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of papillomavirus infection: key to malignant progression. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33-39, 2011.

BOSHART, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; KLEINHEINZ, A.; SCHEURLEN, W.; ZUR HAUSEN, H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 3, n. 5, p. 1151-1157, 1984.

BOTELHO, J. A. O. **Abortos em gestantes infectadas por *Chlamydia trachomatis* no estado de Mato Grosso do Sul 2005/2007**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BOUDA, M.; GORGOULIS, V. G.; KASTRINAKIS, N. G.; GIANNOUDIS, A.; TSOLI, E.; DANASSI-AFENTAKI, D.; FOUKAS, P.; KYROUDI, A.; LASKARIS, G.; HERRINGTON, C. S.; KITTAS, C. “High risk” HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Modern Pathology**, v. 13, n. 6, p. 644-653, 2000.

BRANDÃO, V. C. R. A. B.; LACERDA, H. R.; XIMENES, R. A. D. A. Frequência de Papilomavírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em gestantes. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 1, p. 43-50, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Monitoramento e Avaliação do SUS. **Planejamento estratégico do Ministério da Saúde 2011-2015: resultados e perspectivas**. 4. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.

BROOKS, G. F.; CARROL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; NIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica**. 25. ed. Porto Alegre: Mcgraw-Hill Brasil, 2012.

BUFFON, A.; CIVA, M.; MATOS, V. F. Avaliação de lesões intra-epiteliais escamosas e microbiologia em exames citológicos realizados em um laboratório de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 2, p. 83-86, 2006.

BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; BAKELS, V.; KENEMANS, P.; WALBOOMERS, J. M. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2739-2743, 1990.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

CAETANO, R.; VIANNA, C. M. M.; THULER; L. C. S.; GIRIANELLI, V. R. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 99-118, 2006.

CAMPOS, K. L. M.; MACHADO, A. P.; ALMEIDA, F. G.; BONIN, C. M.; PRATA, T. T. M.; ALMEIDA, L. Z.; PADOVANI, C. T. J.; FERREIRA, A. M. T.; FERNANDES, C. E. S.; TOZETTI, I. A. Good agreements between self and clinician-collected specimens for the detection of human papillomavirus in Brazilian patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 1-4, 2014.

CANNIZZARO, L. A.; DÜRST, M.; MENDEZ, M. J.; HECHT, B. K.; HECHT, F. Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 33, n. 1, p. 93-98, 1988.

CARVALHO, N. O. **Comparação dos métodos de tipagem do HPV por meio de amplificação por PCR usando-se iniciadores tipo-específicos e por sequenciamento direto do produto amplificado**. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina/UFMG, Belo Horizonte, 2009.

CATLIN, B. W. Gardnerella vaginalis: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 3, p. 213-237, 1992.

CERVANTES, J.; LEMA, C.; HURTADO, L.; ANDRADE, R.; QUIROGA, G.; GARCIA, G.; SONODA, S. Prevalence of human papillomavirus infection in rural villages of the Bolivian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 131-5, 2003.

CIUFFO, G. Innesso positive com filtrate di verruga volgare. **Gior Ital Mal Venner**, v. 48, n. 1, p. 12-17, 1907.

CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; MUÑOZ, N.; SNIJDERS, P. J.; VACCARELLA, S.; FRANCESCHI, S. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **The Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 991-998, 2005.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CUSCHIERI, K. S.; CUBIE, H. A.; WHITLEY, M. W.; SEAGAR, A. L.; ARENDS, M. J.; MOORE, C.; MCGOOGAN, E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 1, p. 68-72, 2004.

DANIELSSON, D.; TEIGEN, P. K.; MOI, H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1230, n. 1, p. 48–58, 2011.

de SANJOSÉ, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 7, p. 453-459, 2007.

de VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. 2004. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DELUCA, G. D.; BASILETTI, J.; SCHELOVER, E.; VÁSQUEZ, N. D.; ALONSO, J. M.; MARÍN, H. M.; Lucero, R. H.; PICCONI, M. A. Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 567-572, 2011.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. **PCR Methods and Applications**, v. 3, n. 3, p. 30-37, 1993.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 1, p. 7-15, 2005.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**. v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p.55-70, 2012.

DUMONCEAUX, T. J.; SCHELLENBERG, J.; GOLESKI, V.; HILL, J. E.; JAOKO, W.; KIMANI, J.; SEVERINI, A. Multiplex detection of bacteria associated with normal microbiota and with bacterial vaginosis in vaginal swabs by use of oligonucleotide-coupled fluorescent microspheres. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4067-4077, 2009.

DURST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; ZUR HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12, p. 3812–15, 1983.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934-937, 1989.

DZUBA, I. G.; DÍAZ, E. Y.; ALLEN, B.; LEONARD, Y. F.; LAZCANO PONCE, E. C.; SHAH, K. V.; BISHAI, D.; LORINCZ, A.; FERRIS, D.; TURNBULL, B.; HERNÁNDEZ, A. M.; SALMERÓN, J. The acceptability of self-collected samples for HPV testing vs. the pap test as alternatives in cervical cancer screening. **Journal of women's health & gender-based medicine**, v. 11, n. 3, p. 265-275, 2002.

FEDREZZI, E. N. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. **Revista Brasileira de**

**Patologia do Trato Genital Inferior**, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2011.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Ongene**, v. 22, n. 33, p. 5201-5207, 2003.

FEITOSA, R. N. M. **Associação entre marcadores da resposta inflamatória e a imunopatogênese de agentes infecciosos de natureza viral (vírus da dengue, HTLV-1 e HTLV-2) e bacteriana (*Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*)**. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas/UEPA, Belém, 2010.

FREEMAN, B.; SMITH, N.; CURTIS, C.; HUCKETT, L.; MILL, J.; CRAIG, I. W. DNA from buccal swabs recruited by mail: evaluation of storage effects on long-term stability and suitability for multiplex polymerase chain reaction genotyping. **Behavior genetics**, v. 33, n. 1, p. 67-72, 2003.

GAO, W.; WENG, J.; GAO, Y.; CHEN, X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. **BioMedClinical infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 271, 2013.

GENPATH. WOMEN'S HEALTH – for Physicians. Disponível em: <<http://www.genpathdiagnostics.com/womens-health/gencerv/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

GILLET, E.; MEYS, J. F.; VERSTRAELEN, H.; BOSIRE, C.; SUTTER, P.; TEMMERMAN, M.; BROECK, D. V. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. **BioMedCentral Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 10, 2011.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 4, p. 1310-1313, 1976.

GISSMANN, L.; WOLNIK, L.; IKENBERG, H.; KOLDOVSKY, U.; SCHNURCH, H. G.; ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 2, p. 560-563, 1983.

GRAVITT, P. E.; LACEY, J. V.; BRINTON, L. A.; BARNES, W. A.; KORNEGAY, J. R.; GREENBERG, M. D.; GREENE, S. M.; HADJIMICHAEL, O. C.; MCGOWAN, L.; MORTEL, R.; SCHWARTZ, P. E.; ZAINO, R.; HILDESHEIM, A. Evaluation of self-collected cervicovaginal cell samples for human papillomavirus testing by polymerase chain reaction. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, v. 10, n. 2, p. 95-100, 2001.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q.; WHEELER, C. M.; COUPLÉE, F.; HILDESHEIM, A.; APPLE, R. J. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C.; WHEELER, C.; APPLE, R.; HIGUCHI, R.; SHAH, K. V. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. **Journal of Virological Methods**, v. 112, n. 1, p. 23-33, 2003.

GUIMARAES-PERES, A.; PORTAELS, F.; DE RIJK, P.; FISSETTE, K.; PATTYN, S. R.; VAN VOOREN, J. P.; FONTEYNE, P. A. Comparison of two PCRs for detection of *Mycobacterium ulcerans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 206-208, 1999.

GUO, M.; SNEIGE, N.; SILVA, E. G.; JAN, Y. J.; COGDELL, D. E.; LIN, E.; LUTHRA, R.; ZHANG, W. 2007. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Modern Pathology**, v. 20, n. 2, p. 256-266, 2007.

HALBE, H. W. **Tratado de ginecologia**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 1993.

HAMONT, D.; VAN HAM, M. A. P. C.; BAKKERS, J. M. J. E.; MASSUGER, L. F. A.; MELCHERS, W. J. G. Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3122, 2006.

HINRICHSEN, S. L. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 127, n. 8, p. 940-945, 2003.

HWANG, T. S.; JEONG, J. K.; PARK, M.; HAN, H. S.; CHOI, H. K.; PARK, T. S. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. **Gynecologic Oncology**, v. 90, n. 1, p. 51-56, 2003.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **A reveal of human carcinogenesis**. 1. ed. France: Lyon, 2012.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Human Papillomaviruses**. 1. ed. France: Lyon, 2007.

ICO. Information Centre on HPV and Cancer. **Human Papillomavirus and Related Diseases Report**. 1. ed. Barcelona: ICO, 2014.

IGANSI, C. N. **Prevalência de Papilomavírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, RS**. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

IGIDBASHIAN, S.; BOVERI, S.; SPOLTI, N.; RADICE, D.; SANDRI, M. T.; SIDERI, M. Self-collected human papillomavirus testing acceptability: comparison of two self-sampling modalities. **Journal Womens Health**, v. 20, n. 3, p. 397-402, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa | 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

ISHAK, M. O. G.; ISHAK, R. O impacto da infecção por *Chlamydia* em populações indígenas da Amazônia brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 2, p. 385-96, 2001.

JAYAPRAKASH, T. P.; SCHELLENBERG, J. J.; HILL, J. E. Resolution and characterization of distinct cpn60-based subgroups of *Gardnerella vaginalis* in the vaginal

microbiota. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JEROME, K. R.; HUANG, M. L.; WALD, A.; SELKE, S.; COREY, L. Quantitative stability of DNA after extended storage of clinical specimens as determined by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2609-2611, 2002.

JOESOEUF, M. R.; WIKNJOSASTRO, G.; NOROJONO, W.; SUMAMPOUW, H.; LINNAN, M.; HANSELL, M. J.; HILLIS, S. E.; LEWIS, J. Coinfection with chlamydia and gonorrhoea among pregnant women with bacterial vaginosis. **International journal of STD & AIDS**, v. 7, n. 1, p. 61-64, 1996.

KAHN, J. A.; BERNSTEIN, D. I.; ROSENTHAL, S. L.; HUNG, B.; KOLLAR, L. M.; COLYER, J. L.; TISSOT, A. M.; HILLARD, P. A.; WITTE, D.; GROEN, P.; SLAP, G. B. Acceptability of human papillomavirus self testing in female adolescents. **Sexually Transmitted Infections**, v. 81, n. 5, p. 408-414, 2005.

KAHN, J. A. SLAP, G. B.; HUANG, B.; ROSENTHAL, S. L.; WANCHICK, A. M.; KOLLAR, L. M.; HILLARD, P. A.; WITTE, D.; GROEN, P.; BERNSTEIN, D. I. Comparison of adolescent and young adult self-collected and clinician-collected samples for human papillomavirus. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, n. 5, p. 952-959, 2004.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. **Current Cancer Drug Targets**. v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; JENKINS, A.; PETTERSEN, E.; KRISTENSEN, G.; HOLM, R.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2095-2100, 1996.

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**. v. 24 n. 3, p. 63-70, 2006.

KLUG, S. J.; MOLIJN, A.; SCHOPP, B.; HOLZ, B.; IFTNER, A.; QUINT, W.; SNIJDERS, P.; PETRY, K. U.; KRÜGER, K. S.; MUNK, C.; IFTNER, T. Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 7, p. 1264-74, 2008.

KROUPIS, C.; MARKOU, A.; VOURLIDIS, N.; DIONYSSIOU-ASTERIOU, A.; LIANIDOU, E. S. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. **Clinical biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 727-731, 2006.

LAZCANO-PONCE, E.; LORINCZ, A. T.; CRUZ-VALDEZ, A.; SALMERÓN, J.; URIBE, P.; VELASCO-MONDRAGÓN, E.; NEVAREZ, P. H.; ACOSTA, R. D.; HERNÁNDEZ-AVILA, M. Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9806, p. 1868-1873, 2011.

- LEE, S. A.; KANGA, D.; SEOB, S. S.; JEONGC, J. K.; YOOA, K. Y.; JEONB, Y. T.; KIMB, J. W.; PARKB, N. H.; KANGB, S. B.; LEEB, H. P.; SONG, Y. S. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPVDNAChip™. **Cancer letters**, v. 198, n. 2, p. 187-192, 2003.
- LEE, J. E.; LEE, S.; LEE, H.; SONG, Y. M.; LEE, K.; HAN, M. J.; KO, G. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. **PloS One**, v. 8, n. 5, 2013.
- LEE, Y. M.; LEU, S. Y.; CHIANG, H.; FUNG, C. P.; LIU, W. T. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 34, n. 2, p. 87-91, 2001.
- LEIBOVITZ, E.; POLLACK, H.; MOORE, T.; PAPELLAS, J.; GALLO, L.; KRASINSKI, K.; BORKOWSKY, W. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 3004-3007, 1995.
- LIN, C. Y.; CHAO, A.; YANG, Y. C.; CHOU, H. H.; HO, C. M.; LIN, R. W.; CHANG, T. C.; CHIOU, J. Y.; CHAO, F. Y.; WANG, K. L.; CHIEN, T. Y.; HSUEH, S.; HUANG, C. C.; CHEN, C. J.; LAI, C. H. Human papillomavirus typing with a polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 361-367, 2008.
- LIVENGOOD, C. H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. **Review of Obstetrics & Gynecology**, v. 2, n. 1, p. 28-37, 2009.
- LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 1998, n. 23, p. 27-30, 1998.
- LOWY, D. R.; SOLOMON, D.; HILDESHEIM, A.; SCHILLER, J. T.; SCHIFFMAN, M. Human Papillomavirus Infection and the Primary and Secondary Prevention of Cervical Cancer. **Cancer**, v. 113, n. 7, p. 1980-1993, 2008.
- LUNGU, O.; WRIGHT, J. R.; THOMAS, C.; SILVERSTEIN, S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, n. 2, p. 145-152, 1992.
- LUPPI, C. G.; OLIVEIRA, R. L. S. D.; VERAS, M. A.; LIPPMAN, S. A.; JONES, H.; JESUS, C. H. D.; PINHO, A. A.; RIBEIRO, M. C.; CAIAFFA-FILHO, H. Early diagnosis and correlations of sexually transmitted infections among women in primary care health services. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 14, n. 3, p. 467-477, 2011.
- MACHADO, A. P.; ALMEIDA, F. G.; BONIN, C. M.; PRATA, T. T. M.; ÁVILLA, L; S.; PADOVANI, C. T. J.; FERREIRA, A. M. T.; FERNANDES, C. E. S.; TOZETTI, I. A. Presence of highly oncogenic human papillomavirus in the oral mucosa of asymptomatic men. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 266-270, 2014.
- MADELEINE, M. M.; ANTTILA, T.; SCHWART, S. M.; SAIKK, P.; LEINONE, M.; CART, J. J.; WURSC, M.; JOH, L. G.; GAL, D. A.; DALING, J. R. Risk of cervical cancer

associated with *Chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 3, p. 650–655, 2007.

MADISEN, L.; HOAR, D. I.; HOLROYD, C. D.; CRISP, M.; HODES, M. E.; REYNOLDS, J. F. The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. **American journal of medical genetics**, v. 27, n. 2, p. 379-390, 1987.

MAHONY, J. B.; LUINSTRA, K. E.; JANG, D.; SELIORS, J. W.; CHERNESKY, M. A. Chlamydia trachomatis confirmatory testing of PCR-positive genitourinary specimens using a second set of plasmid primers. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, n. 5, p. 381-388, 1992.

MARCOLINO, L. D.; POLETTINI, J.; TRISTÃO, A. R.; MARQUES, M. E. A.; CANDEIAS, J. M. G.; VELA, R. A. R.; SILVA, M. G. Coinfecção de *Chlamydia trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 19, n. 2, p. 5-10, 2008.

MARTIN, D. H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 343, n. 1, p. 2, 2012.

MARQUES, C. A. S.; MENEZES, M. L. B. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* e esterilidade. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 1, p. 66-70, 2005.

MENARD, J. P.; FENOLLAR, F.; HENRY, M.; BRETELLE, F.; RAOULT, D. Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to Predict Bacterial Vaginosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 1, p. 33–43, 2008.

MENARD, J. P.; FENOLLAR, F.; RAOULT, D.; BOUBLI, L.; BRETELLE, F. Self-collected vaginal swabs for the quantitative real-time polymerase chain reaction assay of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* and the diagnosis of bacterial vaginosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 513-518, 2012.

MENDOZA, L.; MONGELOS, P.; PAEZ, M.; CASTRO, A.; RODRIGUEZ-RIVEROS, I.; GIMENEZ, G.; ARAUJO, P.; ECHAGÜE, G.; DIAZ, V.; LASPINA, F.; CASTRO, W.; JIMENEZ, R.; MARECOS, R.; EVER, S.; DELUCA G.; PICCONI, M. A. Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay: a cross-sectional analytical study. **BioMedCentral Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 531, 2013.

MENEZES E SILVA, C. H. P.; NEUFELD, P. M.; SATO, D. **Bacteriologia e Micologia para laboratório clínico**. 1. ed. São Paulo: Revinter, 2006.

MINOTTO, F. N. **Influência da infecção genital pelo Papilomavirus humano no ciclo de resposta sexual feminino**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina/USP, São Paulo, 2009.

MIRANDA, A. E. B. **Perfil de comportamento e prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* em adolescentes do sexo feminino residentes na região de Maruípe em Vitória, ES**. 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saude Publica, Rio de Janeiro, 2003.

MORAES, D. R. P. L. **Detecção e genotipagem do Papilomavírus humano (HPV) em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau.** 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) - Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Campinas, 2008.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, v. 1, n. 2, p. 1-5, 2000.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MUÑOZ, N.; MÉNDEZ, F.; POSSO, H.; MOLANO, M.; VAN DEN BRULE, A. J.; RONDEROS, M.; MEIJER, C.; MUÑOZ, A. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 12, p. 2077-2087, 2004.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MURTA, E. F. C.; SOUZA, M. A. H.; JÚNIOR, E. A.; ADAD, S. J. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological smears. **Revista Paulista de Medicina**, v. 118, n. 4, p. 105-8, 2000.

NARDIS, C.; MOSCA, L.; MASTROMARINO, P. Vaginal microbiota and viral sexually transmitted diseases. **Annali di Igiene, Medicina Preventiva e di Comunità**, v. 25, n. 5, p. 443-56, 2013.

NETO, V. A.; BALDY, J. L. **Doenças Transmissíveis.** 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

NOBRE, R. J.; DE ALMEIDA, L. P.; MARTINS, T. C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 1, p. 13-21, 2008.

NORUSIS, M.J **SPSS 10.0:** Guide to data analyses. 1. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2000.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 297-301, 1991.

OLIVEIRA, C. M. **Existe câncer cervical HPV negativo?** 2011. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **The British Journal of Venereal Diseases**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 1971.

PADOVANI, C. T. J. **Detecção de marcadores fenotípicos de células t regulatórias e suas citocinas em pacientes HPV infectadas.** 2013. 169 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

PEIXOTO, S. **Infecção genital na mulher**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2007.

PETIGNAT, P.; FALTIN, D. L.; BRUCHIM, I.; TRAMÈR, M. R.; FRANCO, E. L.; COUTLÉE, F. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 2, p. 530-535, 2007.

PITTA, D. R.; CAMPOS, E. A.; SARIAN, L. O.; ROVELLA, M. S.; DERCHAIN, S. F. M. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 7, p. 315-320, 2010.

PLETT-TORRES, T.; CRUZ-VALDEZ, A.; ESQUIVEL-GUADARRAMA, F.; HERNÁNDEZ-NEVAREZ, P.; LAZCANO-PONCE E.; GUTIÉRREZ-XICOTENCATL L. Frequency of antibodies against E4 and E7 from human papillomavirus type 16 in Mexican soldiers. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 97-114, 2007.

POIARES, L. D. A.; SANDRINI, F.; OSÓRIO, P. D. S.; LARGURA, Á.; SIMÃO, R. D. C. G. Validação do método de detecção de *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p. 229-232, 2008.

QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T.; ZAIA, J. E. O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 151-157, 2007.

RICHARDSON, E.; SELLORS, J. W.; MACKINNON, S.; WOODCOX, V.; HOWARD, M.; JANG, D.; KARWALAJTYS, T.; CHERNESKY, M. A. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infections and specimen collection preference among women, using self-collected vaginal swabs in community settings. **Sexually transmitted diseases**, v. 30, n. 12, p. 880-885, 2003.

RIPA, T.; NILSSON, P. A. A *Chlamydia trachomatis* Strain With a 377-bp Deletion in the Cryptic Plasmid Causing False-Negative Nucleic Acid Amplification Tests. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 34, n. 5, p.255–256, 2007.

RODRIGUEZ, P.; VEKRIS, A.; BARBEYRAC, B.; DUTILH, B.; BONNET, J.; BEBEAR, C. Typing of *Chlamydia trachomatis* by restriction endonuclease analysis of the amplified major outer membrane protein gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1132-1136, 1991.

ROETERS, A. M. E.; BOON, M. E.; HAAFTEN, M. V.; VERNOOIJ, F.; BONTEKOE, T. R.; HEINTZ, A. P. M. Inflammatory events as detected in cervical smears and squamous intraepithelial lesions. **Diagnostic Cytopathology**, v. 38, n. 2, p. 85-93, 2009.

RONCAGLIA, M. T. **Valor da captura híbrida para o Papilomavírus humano (HPV) no seguimento de pacientes submetidos à conização do colo uterino devido a lesão intraepitelial de alto grau por cirurgia de alta frequência (CAF)**. 2012. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina/USP, São Paulo, 2012.

ROSSETTI, M. A.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SANDRI, M. T.; LENTATI, P.; BENINI, E.; DELL'ORTO, P.; ZORZINO, L.; CAROZZI, F. M.; MAISONNEUVE, P.; PASSERINI, R.; SALVATICI, M.; CASADIO, C.; BOVERI, S.; SIDERI, M. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2141-2146, 2006.

SANTO, I.; AZEVEDO, J.; BORREGO, M. J.; GOMES, J. P.; VERDASCA, N.; PISTA, A. *Chlamydia trachomatis* infection in patients selected for HPV detection. In: 27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, **Anais...** Alemanha: Berlim 2011. p. 17-23.

SANTOS, M. S. **Virchow**: medicina, ciência e sociedade no seu tempo. 1. ed. Portugal: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2008.

SANTOS, S. H. R. **Associação dos tipos e variantes de HPV com o diagnóstico histológico em mulheres com anormalidades em células glandulares do colo uterino**. 2005. 94 f. Tese (Doutorado em Tocoginecologia) - Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Campinas, 2005.

SARIAN, L. O. Z. **Variação na detecção do DNA-HPV de alto risco oncogênico no seguimento de mulheres portadoras de neoplasia intra-epitelial cervical tratadas com conização por alça diatérmica**. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) – Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Campinas, 2003.

SASLOW, D.; CASTLE, P. E.; COX, J. T.; DAVEY, D. D.; EINSTEIN, M. H.; FERRIS, D. G.; GARCIA, F. American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n. 1, p. 7-28, 2007.

SAPP, M; DAY, P. M. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 400-409, 2009.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129-1136, 1990.

SCHMITT, V. M. Papilomavírus Humano. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. (Org.). **Doenças infecciosas: Diagnóstico molecular**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, p. 135-147.

SCHWEBKE, J. R.; FLYNN, M. S.; RIVERS, C. A. Prevalence of Gardnerella vaginalis among women with lactobacillus-predominant vaginal flora. **Sexually Transmitted Infections**, v. 90, n. 1, p. 61-63, 2013.

SCOTT, M.; STITES, D. P.; MOSCICKI, A. B. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 751-55, 1999.

SEADI, C. F.; ORAVEC, R.; POSER, B.; 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. M. F. *Chlamydia trachomatis*. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. (Org.). **Doenças infecciosas: Diagnóstico molecular**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 5, p. 61-73.

SHA, E. B.; CHEN, H. Y.; WANG, Q. J.; ZARIFARD, M. R.; COHEN, M. H.; SPEAR, G. T. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4607-4612, 2005.

SHIBATA, D. K.; ARNHEIM, N.; MARTIN, W. J. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 1, p. 225-230, 1988.

SHIM, H.; NOH, S.; PARK, A.; LEE, Y.; KIM, J.; CHUNG, H.; KANG, K.; CHO, N. H. Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by multiplex-PCR. **BioMedCentral Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 284, 2010.

SHOPE, R. E.; HURST, E. W. Infectious Papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 58, n. 5, p. 607-24, 1933.

SILVA, A. M. T. C.; CRUZ, A. D.; SILVA, C. C.; BORGES, F. R.; CURADO, M. P. Genotipagem de papiloma vírus humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 167-174, 2003.

SILVA, J. R. S. N. **Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV 16 em *Pichia pastoris***. 2010. 104 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Química/USP, São Paulo, 2010.

SMITH, E. M.; RITCHIE, J. M.; SUMMERSGILL, K. F.; KLUSSMANN, J. P.; LEE, J. H.; WANG, D.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 5, p. 766-772, 2004.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SPAARGAREN, J.; FENNEMA, H. S.; MORRÉ, S. A.; DE VRIES, H. J.; COUTINHO, R. A. New lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variant, Amsterdam. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1090–1092, 2005.

STERN, P. L.; BROWN, M.; STACEY, S. N.; KITCHENER, H. C.; HAMPSON, I.; ABDEL-HADY, E. S.; MOORE, J. V. Natural HPV immunity and vaccination strategies. **Journal of Clinical Virology**, v. 19, n. 1, p. 57-66, 2000.

STOTHARD, D. R.; WILLIAMS, J. A.; POL, B. V. D.; JONES, R. B. Identification of a *Chlamydia trachomatis* Serovar E Urogenital Isolate Which Lacks the Cryptic Plasmid. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 6010, 1998.

STRAUSS, M. J.; SHAW, E. W.; BUNTING, H.; MELNICK, J. L. Crystalline virus like particles from skin papilomas characterized by intranuclear inclusion bodies. **Proceedings of**

**the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 72, n. 1, p. 46-50, 1949.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, n. 6, p. 379-386, 1999.

SVARE, E. I.; KJAER, S. K.; WORM, A. M.; ØSTERLIND, A.; MEIJER, C. J. L. M.; VAN DEN BRULE, A. J. C. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. **Sexually transmitted infections**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2002.

SWAN, D. C.; TUCKER, R. A.; TORTOLERO-LUNA, G.; MITCHELL, M. F.; WIDEROFF, L.; UNGER, E. R.; NISENBAUM, R. A.; REEVES, W. C.; ICENOGLE, J. P. Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1030-1034, 1999.

TATTI, S. A. **Colposcopia e patologias do trato genital inferior: vacinação contra o HPV**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

TINDLE, R. W.; FRAZER, I. H. Immune response to human papillomaviruses and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 186, n. 1, p. 217-253, 1994.

TOZETTI, I. A.; SCAPULATEMPO, I. D. L.; KAWSKI, V. L.; FERREIRA, A. W.; LEVI, J. E. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 309-310, 2006.

TRISTAO, W.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, C. A.; BETIOL, J. C.; BETTINI, J. S. R. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 4, p. 66-70, 2012.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 43, n. 1, p. 18-26, 2000.

VARELLA, R. Q.; PASSOS, M. R. L.; PINHEIRO, V. M. S.; LOPES, H. R.; SANTOS, S. B.; GUIMARAES, C. C.; DEANGELIS, F. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* em mulheres do município de Piraí-rio de Janeiro. **Jornal de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 12, n. 3, p. 27-44, 2000.

VAZ, F. A. C.; CECCON, M. E. J.; DINIZ, E. M. A. Infecção por *Chlamydia trachomatis* no período neonatal: aspectos clínicos e laboratoriais. Experiência de uma década: 1987-1998. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 303-11, 1999.

VILLA, L. L.; DENNY, L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, n. 1, p. 71-80, 2006.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12-19, 1999.

WIESENFELD, H. C.; HILLIER, S. L.; KROHN, M. A.; LANDERS, D. V.; SWEET, R. L.

Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 663-668, 2003.

WILLIAMS, V. M.; FILIPPOVA, M.; SOTO, U.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future Virology**, v. 6, n. 1, p. 45-57, 2011.

WINER, R. L.; FENG, Q.; HUGHES, J. P.; YU, M.; KIVIAT, N. B.; O'REILLY, S.; KOUTSKY, L. A. Concordance of self-collected and clinician-collected swab samples for detecting human papillomavirus DNA in women 18 to 32 years of age. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 34, n. 6, p. 371-377, 2007.

WHO. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008**. 1. ed. Geneva: WHO Press, 2008.

WHO. Information Centre on HPV and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Summary Report 2010. Disponível em: <[www.who.int/hpvcentre/en/Almeida FG](http://www.who.int/hpvcentre/en/Almeida FG)>. Acesso em: 3 set. 2014.

WHO. **Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, syphilis and Trichomonas vaginalis**. 1. ed. Geneva: WHO Press, 2011.

WU, D. Y.; UGOZZOLI, L.; PAL, B. K.; QIAN, J.; WALLACE, R. B. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. **DNA and Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 233-238, 1991.

WUNDER, P. R.; CAJUEIRO, J. C. A imunologia e a imunopatologia das infecções causadas por *Chlamydia trachomatis*. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 62-71, 2005.

ZAMPIROLO, J. A.; MERLIN, C. J.; MENEZES, E. M. Prevalência de HPV de baixo e alto risco pela técnica de biologia molecular (Captura Híbrida II) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 4, p. 265-268, 2007.

ZARIFFARD, M. R.; SAIFUDDIN, M.; SHA, B. E.; SPEAR, G. T. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, Gardnerella vaginalis and Mycoplasma hominis. **Federation of European Microbiological Societies - Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 277-281, 2002.

ZHANG, S.; CI, P.; VELICER, C.; KANG, L.; LIU, B.; CUI, J.; CHEN, F.; ZHANG, X.; CHANG, I. J.; ROBERTS, C. C.; SMITH, J. S.; CHEN, W.; QIAO, Y. Comparison of HPV genotypes and viral load between different sites of genital tract: The significance for cervical cancer screening. **Cancer Epidemiology**, v. 38, n. 2, p. 168-173, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v. 36, n. 2, p. 794, 1976.

ZUR HAUSEN, H. de VILLIERS, E. M. Human papillomavírus. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 427-447, 1994.



## ANEXO 1

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** COINFECÇÃO POR Papilomavírus humano E Chlamydia trachomatis OU Gardnerella vaginalis EM AMOSTRAS DE CÉRVICE UTERINA

**Pesquisador:** Júlio Menta de Almeida

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 19253213.6.0000.0021

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

**Patrocinador Principal:** FUND. DE APOIO E DE DESENV. DO ENSINO, CIENCIA E TECN. DO ESTADO DO MS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 383.072

**Data da Relatoria:** 08/08/2013

*Continuação do Parecer:* 383.072

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CAMPO GRANDE, 04 de Setembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Edilson dos Reis**  
**(Coordenador)**