ALINE TEIXEIRA AMORIM

Análise da coinfecção entre ureaplasmas e o Vírus do Papiloma Humano (HPV) em amostras cervicais e em um modelo de estudo “in vitro” de queratinócitos primários humanos (PHK)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2015

ALINE TEIXEIRA AMORIM

Análise da coinfecção entre ureaplasmas e o Vírus do Papiloma Humano (HPV) em amostras cervicais e em um modelo de estudo “in vitro” de queratinócitos primários humanos (PHK)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Amorim, Aline Teixeira.

Análise da coinfeção entre ureaplasmas e o vírus do Papiloma Humano (HPV) em amostras cervicais e em um modelo de estudo "*in vitro*" de queratinócitos primários humanos (PHK) / Aline Teixeira Amorim. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Mollicutes e o câncer cervical.

Versão do título para o inglês: Analysis of coinfection among ureaplasmas and Human Papilloma Virus (HPV) in cervical samples and a study in vitro in primary human Keratinocytes (PHK).

1. Ureaplasmas 2. HPV 3. Lesão cervical 4. Citocinas 5. Queratinócitos primários humanos (PHK) 6. Efeito citopático I. Timenetsky, Prof. Dr. Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB015/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Teixeira Amorim

Título da Dissertação: Análise da coinfeção entre ureaplasmas e o Vírus do Papiloma Humano (HPV) em amostras cervicais e em um modelo de estudo “in vitro” de queratinócitos primários humanos (PHK)

Orientador(a): Prof. Dr. Jorge Timenetsky

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 28 de novembro de 2012.

PARECER 1089/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 22.11.2012, APROVOU o projeto intitulado: "*Estudo das interações "in vivo e in vitro" da coinfeção entre Ureaplasma urealyticum e Ureaplasma parvum e o Vírus do Papiloma humano (HPV)*", dos autores **Jorge Timenetsky** e **Alline Teixeira Amorim**.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **22.11.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Aos meus pais, Ideni e Dalvadísio, por me oferecerem os maiores presentes que uma família pode proporcionar: o amor, a honestidade e a força de vontade de correr atrás dos sonhos. Ao meu irmão, Alan, pelo amor, amizade e pelos ensinamentos compartilhados no cotidiano. Ao meu noivo, Antonio Carlos R. Braga Junior por todo amor, carinho, paciência e apoio em todos os momentos. Muito obrigada por compartilharem comigo mais essa etapa! Amo muito, cada um de vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro, sem o qual este estudo não seria realizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os anjos, em vida e no plano espiritual, por me guiarem sempre para os melhores caminhos.

A minha querida mãe Ideni (Isa) e ao meu querido pai Dalvadísio (Dasio), por serem esses seres iluminados e por terem me ajudado tanto até aqui, por me apoiarem, mesmo que as vezes tudo parecesse tão incerto. Por me demonstrarem que mais importante que os bens materiais é a busca dos sonhos de maneira honesta, com amor e com a consciência tranquila, visando sempre um bem maior. Meu amor sempre será infinito! Ao meu querido irmão, Alan, por ser um menino cheio de vontade de viver, e por demonstrar um amor tão sublime, o que me faz ter vontade de seguir adiante, mesmo diante das dificuldades. Ao meu noivo, Antonio Carlos Ricardo Braga Junior, por todo carinho, amor e apoio dados a cada dia. Obrigada por ter tamanha paciência com a distância e com os momentos de dificuldade, e também por ter me ensinado tanto e por permitir trilhar ao seu lado um caminho repleto de conquistas, aprendizados, amor e paz.

Agradeço a toda minha família Amorim, minhas tias, tios e primos, pelo apoio, carinho, alegria, pela torcida nos momentos difíceis e por entenderem minha ausência nos grandes momentos de família. À família Teixeira por todo afeto. Agradeço também a família Muniz, principalmente à minha sogra Rosalina e ao meu cunhado Luiz Henrique por todo apoio e carinho.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Dr. Jorge Timenetsky por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização deste trabalho, e por ter compartilhado tamanha sabedoria, transmitindo mais do que conhecimento acadêmico, mas também sabedoria de vida!

Ao meu co-orientador Dr. Lucas Miranda Marques, por ter aberto o caminho indescritível da ciência, e por ter dado tantos conselhos proveitosos, também pela amizade, pelas oportunidades, pela paciência e pelas lições de vida, e por ter me ajudado a ser a profissional e o ser humano que sou hoje. Minha eterna amizade e gratidão a você e a toda família Marques pelos inúmeros momentos felizes!

À minha amiga Verena Macedo Santos, pela companhia no laboratório e por ser meu anjo da guarda em tantos momentos. Sem ela este trabalho teria sido muito mais difícil. Obrigada, querida Vêu! Ao amigo Guilherme Barreto Campos pela amizade indescritível, pela alegria de viver e por todos os momentos tão queridos! À Tassia Neves Lobão, por ter me apoiado tanto no início do mestrado, e por ter sido tão amiga todo este tempo. À querida amiga, Ana Marcia Guimarães, por tamanho carisma e amizade, e também por seu conhecimento e comprometimento profissional, os quais têm servido de exemplo para mim.

Agradeço imensamente a Aricelma Souza França por ser uma verdadeira mãe, apoiando, aconselhando e fornecendo toda ajuda necessária para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de várias moradas, Abraão, Gisela, Laila (Nega), Izadora, Maysa, Tássia e Verena. Obrigada por abrirem as portas pra mim e me receberem com tanto carinho e amor nessas diversas etapas!

Aos amigos do laboratório Micoplasma: Aricelma, Ana Marcia, Angelita, Camila, Carol, Carlos, Denise, Guilherme, Hellen Braga, Hellen Martins, Izadora, Maysa, Natália, Regis, Tássia e Verena, por toda ajuda, apoio e por tantos momentos felizes que passamos juntos nesses 2 anos!

Aos queridos amigos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (IMS/CAT) (Arianne, Beatriz, Clarissa, Ewerton, Hellen, Ícaro, Igor, Janinne, Jéssica, Karol, Mariângela, Matheus, Nathan, Patrícia, Suzi, e aos ingressantes), pelos momentos agradáveis compartilhados no ambiente de trabalho e por toda ajuda prestada.

Ao laboratório de oncovirologia, agradeço toda ajuda disponibilizada principalmente pelo Dr. Enrique Boccardo e pela Vanesca Lino, por tamanho conhecimento e paciência transmitidos. Sem a ajuda fornecida este trabalho não poderia ser concluído.

A todos os integrantes do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano (INCT/HPV), principalmente à Dra. Luisa Lina Villa, por ter aberto as portas do instituto para a realização deste trabalho e por todo apoio, paciência e pela transmissão de tamanha sabedoria e humildade. Agradeço também à Maria Antonieta A. Andreoli, por todo trabalho, apoio e amizade transmitidos nesta parceria. Também ao Ricardo César Cintra, por todo o carinho, amizade e sabedoria compartilhados. Serei eternamente grata por tudo a todos!

Ao Dr. Gerson Maciel, por todo suporte nas coletas e também a todas as mulheres que concordaram em participar do presente estudo, sem as quais esse trabalho não poderia ser realizado. Ao Dr. Djanilson Barbosa dos Santos, por toda colaboração na análise multivariada.

Aos amigos conquistados no ICB: Danielle, Diana, Elisabeth, Enyd, Ewerton, Felipe Rezende, Gisela, Luana, Lucas, Lucia, Luciano Queiroz, Lucianne, Luis, Quêzia, Maria Jacinta, Natyelle, Patrícia, Rúbens, Vanesca Lino, Vanessa Feitosa, Victor Pimentel, Viviane Arenas, Wallason Abjaude.

Aos amigos de longa data: Camila Amorim, Carlos Helder, Danilo Cariri, Daniel Sousa, Daniela Amorim, Danyllo Lessa, Débora Bomfim, Emiliana Cruz, Gleisy, Kayo Moraes, Marcelo Barreto, Marilda Maior, Marina Oliveira, Maurício Marques, Priscila Leão, Patrícia Maior, Rafaella de Souza, Simone Souza, Thiago Henrique.

Aos colegas da APG/ICB, por tantos momentos felizes, pela elaboração da primeira festa de acolhimento aos ingressantes da pós-graduação do ICB, e por tantos esclarecimentos relacionados a vida do pós-graduando fora do laboratório. Muito obrigada!

Aos funcionários, Gisele, Elizabete, Naíde e Izabel da secretaria do departamento de microbiologia do ICB II. Muito obrigada por toda a colaboração e pela paciência nesse período. Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II, por serem tão prestativos e solícitos. Aos funcionários da portaria, segurança, manutenção e limpeza, os quais contribuíram imensamente para que esse trabalho ocorresse de forma eficaz e pacífica.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pelo auxílio prestado na correção deste trabalho. A todos os professores da USP e do IMS/CAT-UFBA, os quais contribuíram tão graciosamente para transmitir seu conhecimento e sabedoria de vida, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ainda a todos aqueles amigos e familiares não citados aqui diretamente. Todos contribuíram com suas parcelas de amizade, conhecimento e construção ao longo da minha vida. Muitíssimo obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Sua jornada tem moldado você para o seu bem, e tudo foi do jeito exato que precisava ser. Não pense que perdeu tempo. Você passou por toda e cada situação para lhe deixarem como você está agora. E agora é a hora certa.”

Asha Tyson

RESUMO

AMORIM, A. T. **Análise da coinfeção entre ureaplasmas e o Vírus do Papiloma Humano (HPV) em amostras cervicais e em um modelo de estudo “in vitro” de queratinócitos primários humanos (PHK).** 2015. 123 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

O câncer cervical é o quarto mais comum entre mulheres no mundo. O seu desenvolvimento depende da exposição ao HPV, fator necessário, mas não suficiente. Diversos cofatores têm sido estudados, dentre eles a coinfeção com *U. urealyticum* e *U. parvum*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de *U. urealyticum* e *U. parvum* em mulheres com e sem lesão cervical, bem como relacionar os achados com variáveis comportamentais, clínico-demográficas e a presença de outros microrganismos de importância ginecológica. Além disso, avaliar “in vitro” a associação de *Ureaplasma* spp. com o HPV em queratinócitos primários humano (PHK) transformados com as proteínas E6 e E7 de HPV-16. Foram obtidos swabs vaginais de 140 mulheres com e sem lesão cervical. O material foi submetido a PCR para a detecção do HPV, *Mollicutes*, *U. urealyticum*, *U. parvum* e seus sorotipos, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis* e *G. vaginalis*, e qPCR para quantificação de *U. urealyticum* e *U. parvum*. Também foi realizada a infecção de *U. urealyticum* e *U. parvum* em PHK transduzidos com vetor pLXSN vazio e contendo os genes E6 e E7. As células foram contadas e realizou-se a dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por ELISA, até 144 horas após a infecção. 63 mulheres (45,3%) foram positivas para HPV, 112 (80,6%) para *Mollicutes*, 8 (5,8%) para *U. urealyticum* por PCR e 19 (13,7%) por qPCR, 70 (50,4%) para *U. parvum* por PCR e 96 (69,1%) por qPCR, 10 (7,2%), 22 (15,8%) e 19 (13,7%) para os sorotipos 1, 3/14 e 6 de *U. parvum*, respectivamente; 4 (2,9%) para *C. trachomatis*, 15 (10,8%) para *N. gonorrhoeae*, 47 (33,8%) para *T. vaginalis* e 101 (72,7%) para *G. vaginalis*. Associações com as lesões cervicais foram encontradas com HPV (O.R. = 6,2), *Mollicutes* (O.R.=5,9), *U. parvum* (por qPCR) (O.R.=2,8), sorotipos 1 (O.R.=0,1) e 6 (O.R.=0,1) de *U. parvum*, *T. vaginalis* (O.R.=27,3) e *G. vaginalis* (O.R.= 11,4). Verificou-se maior carga de *U. parvum* entre mulheres com lesão ($p=0,0006$). Também apresentaram associações com as lesões cervicais: idade maior que 30 anos (O.R.=2,8), residir em zona rural (O.R.=2,6), possuir um relacionamento estável (O.R.= 0,1), vida sexual ativa (O.R.=0,2) e ter tido mais de um parceiro ao longo da vida (O.R.=2,1). No estudo “in vitro”, em relação à curva de crescimento das células, tanto o grupo de células “com HPV” quanto o grupo “sem HPV” infectados com ureaplasmas apresentaram uma diminuição no número de células ao passar dos dias, quando comparado com os grupos não infectados. Em relação às citocinas, não foi observada diferença na liberação de IL-1 β , mas houve maior liberação de IL-6 e TNF- α para ambas as cepas, pelo menos após 48 horas da infecção. De maneira geral, IL-6 apresentou maiores títulos nos grupos de células que expressam proteínas do HPV. *Mollicutes*, principalmente *U. parvum*, demonstraram associação com as lesões cervicais no estudo epidemiológico; além disso, *U. parvum* e *U. urealyticum* demonstraram causar uma diminuição no número tanto de células PHK comuns como naquelas contendo os genes E6/E7 de HPV-16, e aumentar a liberação das citocinas IL-6 e TNF- α pelas células, tanto na presença quanto na ausência de proteínas de HPV. Pelos dados da literatura e os resultados obtidos neste estudo, foi possível verificar uma associação entre os ureaplasmas e HPV no início das lesões cervicais, contudo mais estudos precisam ser realizados para aprimorar essa hipótese.

Palavras-chave: PCR. qPCR. Ureaplasmas. HPV. Lesão cervical. Câncer cervical. IL-1 β . IL-6. TNF- α . Queratinócitos primário humano (PHK). Curva de crescimento celular.

ABSTRACT

AMORIM, A. T. **Analysis of co-infection among ureaplasmas and the Human Papilloma Virus (HPV) in cervical samples and in a infection model *in vitro* in primary human keratinocytes (PHK).** 2015. 123 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Cervical cancer is the fourth most common among women worldwide. Its development depends upon HPV, a necessary factor but not enough, for the disease development. Several cofactors have been studied, including co-infection with *U. urealyticum* and *U. parvum*. The aim of this study was to evaluate the presence of *U. urealyticum* and *U. parvum* in women with cervical lesions and correlate these findings with the behavioral, clinical and demographic variables and the presence of other microorganisms of gynecological importance. Furthermore, evaluate the association *in vitro* among *Ureaplasma* spp. and HPV, in human primary keratinocytes (PHK) transformed with HPV-16 E6 and E7 proteins. Vaginal swabs were collected from 140 women with and without cervical lesion. The material was analyzed by PCR for HPV, *Mollicutes*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and serotypes, *C. trachomatis*, *N. gonorrhea*, *G. vaginalis* and *T. vaginalis*, and by qPCR to quantify *U. urealyticum* and *U. parvum*. We also performed the infection of *U. urealyticum* and *U. parvum* in PHK transduced with vector pLXSN empty and containing the E6 and E7 genes. Cells were quantified, and it was made a titration of IL-1 β , IL-6 and TNF- α by ELISA, up to 144 hours after infection. Sixty three (45.3%) women were positive for HPV, 112 (80.6%) to *Mollicutes*, 8 (5.8%) for *U. urealyticum* by PCR and 19 (13.7%) by qPCR 70 (50.4%) to *U. parvum* by PCR and 96 (69.1%) by qPCR, 10 (7.2%) 22 (15.8%) and 19 (13.7%) for *U. parvum* serotypes 1, 3 / 14 and 6, respectively. Four women (2.9%) were detected with *C. trachomatis*, 15 (10.8%) for *N. gonorrhoeae*, 47 (33.8%) of *T. vaginalis* and 101 (72.7%) for *G. vaginalis*. Associations with cervical lesions were found with HPV (OR = 6.2), *Mollicutes* (OR = 5.9), *U. parvum* (for qPCR) (OR = 2.8), *U. parvum* serotypes 1 (OR = 0.1) and 6 (OR = 0.1), *T. vaginalis* (OR = 27.3) and *G. vaginalis* (OR = 11.4). It was verified greater load of *U. parvum* among women with injury ($p = 0.0006$). Also it was associated with cervical lesions: women with age greater than 30 years (OR = 2.8), living in countryside (OR = 2, 6), have stable relationship (OR = 0.1), sexually active (OR = 0.2) and if she has had more than one partner throughout life (OR = 2.1). The *in vitro* study, the cells growth curve, both the cell group "with HPV" as the group "no HPV", those ureaplasmas infected showed a decrease in cell number over the following days, when compared to uninfected groups. Regarding cytokines, there was no difference in the release of IL-1 β , but there was increased release of IL-6 and TNF- α for both strains at least 48 hours after infection. In general, IL-6 showed higher titers in groups of cells expressing HPV proteins. *Mollicutes*, especially *U. parvum* showed association with cervical lesions in epidemiological studies; Additionally, *U. parvum* and *Ureaplasma urealyticum* shown to cause a decrease of both common PHK cells as those containing genes E6 / E7 of HPV-16, and increase the release of IL-6 and TNF- α cells by cytokines, both in the presence or absence of HPV proteins. The literature data and the results obtained in this study, we found an association between HPV and ureaplasmas at the beginning of cervical lesions, but more studies are needed to enhance this hypothesis.

Keywords: PCR. qPCR. Ureaplasmas. HPV. Cervical injury. Cervical câncer. IL-1 β . IL-6. TNF- α . Primary Human Keratinocytes (PHK). Cell growth curve.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A –	Adenina
AGUS –	Células glandulares atípicas de significado desconhecido
AIDS –	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AIS –	Adenocarcinoma “in situ”
APC –	Célula apresentadora de antígeno
ASCUS –	Células escamosas atípicas de significado desconhecido
atm –	Atmosfera
ATP –	Adenosina tri-fosfato
C –	Citosina
CBPP –	Pleuropneumonia bovina contagiosa
CFS –	Sítios frágeis comuns
CO ₂ –	Gás carbônico
Ct –	<i>Cycle Threshold</i> (Sinal de fluorescência que pode ser detectado)
C+G –	Conteúdo citosina e guanina
DIP –	Doença Inflamatória Pélvica
DMEM -	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP –	Deoxinucleotídeo trifosfato
DST –	Doença Sexualmente Transmissível
D10 –	DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino
EDTA –	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EGF –	Fator de crescimento epitelial
ELISA –	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
E1 – E7 –	Proteínas precoces de HPV (E= <i>early</i>)
FJP –	Fundação João Pinheiro,
g –	Gramas
G –	Guanina
GM-CSF –	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HIV –	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV –	Vírus do Papiloma Humano
HSIL –	Lesão Intra-epitelial de células escamosas de alto grau
hTERT –	Subunidade catalítica da telomerase
IARC –	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IC –	Intervalo de Confiança
ICTV –	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN- α –	Interferon α
IFN- β –	Interferon β
IFN- γ –	Interferon gama
IgA –	Imunoglobulina A
IL –	Interleucina
IL-1 β –	Interleucina 1Beta
IL-6 –	Interleucina 6
IMS/CAT-UFBA –	Instituto Multidisciplinar em Saúde/Campus Anísio Teixeira – Universidade Federal da Bahia
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
Ipea –	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
Kpb –	Kilopares de bases
KSFM -	<i>Keratinocyte serum-free médium</i>
LAMPs –	<i>Mycoplasmal lipid-associated membrane proteins</i>
LCR –	<i>Long control region</i>
LSIL –	Lesão Intra-epitelial de células escamosas de baixo grau
L1 e L2 –	Proteínas tardias de HPV (L= <i>late</i>)
MBA –	<i>Multiple-banded antigen</i> ou antígeno de múltipla banda
MDa –	Megadaltons
mg –	Miligramas
MgCl ₂ –	Cloreto de Magnésio
MHC –	Complexo maior de histocompatibilidade
min –	Minuto
mL –	Mililitro

mM –	Milimolar
mm –	Milímetro
NADH –	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NH ₃ –	Amônia
NIC –	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK –	<i>Natural Killers</i>
nm –	Nanômetro
ORF –	Fase aberta de leitura - <i>Open Reading Frames</i>
OMS (WHO) –	Organização Mundial de Saúde
OR –	<i>Odds Ratio</i>
pb –	Pares de base
PBS –	Tampão fosfato (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
pH –	Potencial de hidrogênio iônico
pmol –	Picomol
PNUD –	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PPLO –	<i>Pleuropneumonia-like Organisms</i>
PV –	Papiloma Vírus
qPCR –	PCR quantitativa ou PCR em tempo real
q.s.p. –	Quantidade suficiente para...
RDR –	Ribonucleosídeo difosfato redutase
RNA –	Ácido ribonucléico
rpm –	Rotações por minuto
rRNA –	RNA ribossômico
tRNA –	RNA transportador
r ² –	R da curva
s –	Segundo
T –	Timina
TCLE –	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β –	Fator de crescimento
TLR –	<i>Toll-like receptor</i>

TNF- α –	Fator de Necrose Tumoral alfa
U –	Unidade
UFC –	Unidade Formadora de Colônia
UFC/ μ L –	Unidade Formadora de Colônia por microlitro
UGA –	Uracila+Guanina+Adenina - Stop códon universal
UNG –	Uretrite não gonocócica
UNG-NC –	Uretrite não gonocócica e não clamidial
USF –	Unidade de Saúde da Família
VB –	Vaginose Bacteriana
X –	Vezes
α –	Alfa
β –	Beta
μ L –	Microlitro
μ m –	Micrômetros
μ m/s –	Micrômetros por segundo
χ^2 –	Teste Qui-quadrado
$^{\circ}$ C –	Graus Celsius
% –	Por cento

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética contendo gêneros e espécies de papilomavírus.....	31
Figura 2 – Árvore filogenética contendo gêneros e espécies de papilomavírus. Nova classificação.	32
Figura 3 – Principais etapas do ciclo de vida do HPV. Epitélio cervical escamoso estratificado e a expressão das proteínas do HPV após a infecção.....	34
Figura 4 – Relações filogenéticas dos grupos de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Mycoplasma pneumoniae</i> da ordem <i>Mycoplasmatales</i>	43
Figura 5 – Morfologia celular diversa no gênero <i>Mycoplasma</i>	45
Figura 6 – Tamanho e morfologia celular de <i>Ureaplasma</i>	50
Figura 7 – Gráficos gerados a partir da reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão utilizada nos testes para a espécie <i>U. urealyticum</i>	68
Figura 8 – Quantificação, por qPCR, de <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i> (UFC/μl) a partir das amostras de swab vaginal, obtidos de mulheres com e sem lesão cervical.....	85
Figura 9 – Curva de crescimento de queratinócitos primários humanos (PHK).....	87
Figura 10 – Liberação de IL-1β por queratinócitos primários humanos (PHK).....	88
Figura 11 – Liberação de IL-6 por queratinócitos primários humanos (PHK).....	89
Figura 12 – Liberação de TNF-α por queratinócitos primários humanos (PHK).....	90

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>Mollicutes</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	60
Quadro 2 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>U. urealyticum</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	61
Quadro 3 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>U. parvum</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	62
Quadro 4 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para sorotipos do <i>U. parvum</i> e os respectivos pesos moleculares dos produtos amplificados.	63
Quadro 5 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	64
Quadro 6 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Gardnerella vaginalis</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	64
Quadro 7 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	65
Quadro 8 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> e o respectivo peso molecular do produto amplificado.	66
Quadro 9 – Sequências dos <i>primers</i> e da sonda utilizados para detecção e quantificação de <i>Ureaplasma urealyticum</i> nas amostras clínicas.	67
Quadro 10 – Sequências dos <i>primers</i> e da sonda utilizados para detecção e quantificação de <i>Ureaplasma urealyticum</i> nas amostras clínicas	67
Quadro 11 – Sequência dos <i>primers</i> de β -globina e o respectivo amplicon produzido, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído	70
Quadro 12 – Sequência dos <i>primers</i> da região L1 de HPV e o respectivo amplicon produzido, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos dos exames citopatológico das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.....	75
Tabela 2 – Resultados obtidos das PCR relacionando com as diferentes lesões presentes no colo do útero das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.	76
Tabela 3 – Resultados obtidos das PCR com relação às lesões de baixo grau e de alto grau (agrupada em graus alto e intermediário) presentes no colo do útero das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.....	78
Tabela 4 – Relação dos grupos caso e controle com a presença de HPV (O.R.= 6,235; I.C.= 2,972 - 13,081), <i>Mollicutes</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> e dos sorotipos 1, 3 e 14 e 6 de <i>Ureaplasma parvum</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Gardnerella vaginalis</i> detectados por PCR convencional e para <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Ureaplasma parvum</i> em PCR em tempo real (qPCR). Amostras obtidas por meio swab cervical de mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.....	80
Tabela 5 – Perfis demográfico e sexual relacionados com a presença ou ausência de lesão cervical em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.	82
Tabela 6 – Associação das variáveis obtidas por meio da PCR e qPCR e a presença de lesão cervical, com exclusão das variáveis confundidoras. Amostras obtidas por meio swab cervical de mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
2.1 As lesões e o câncer cervical	26
2.2 O Papiloma Vírus Humano (HPV) e o câncer cervical	27
2.2.1 <i>Histórico.....</i>	27
2.2.2 <i>Taxonomia</i>	29
2.2.3 <i>Organização Genômica</i>	33
2.2.4 <i>Replicação viral e transformação celular</i>	33
2.2.5 <i>Resposta imune e o HPV.....</i>	36
2.2.6 <i>História natural e Fatores de risco</i>	38
2.3 Classe <i>Mollicutes</i>.....	39
2.3.1 <i>Histórico.....</i>	39
2.3.2 <i>Taxonomia</i>	40
2.3.3 <i>Biologia.....</i>	41
2.3.4 <i>Patogenicidade</i>	46
2.3.5 <i>Indução de citocinas em <i>Mollicutes</i></i>	47
2.3.6 <i>Ureaplasmas.....</i>	49
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1 Avaliação da presença de <i>Ureaplasma spp.</i> e outros microrganismos de interesse clínico na cérvix de mulheres com e sem lesão cervical	56
4.1.1 <i>Casuística</i>	56
4.1.2 <i>Coleta das amostras.....</i>	57
4.1.3 <i>Cepas utilizadas como padrão.....</i>	58
4.1.4 <i>Extração de DNA das amostras clínicas.....</i>	58
4.1.5 <i>PCR para detecção de <i>Mollicutes</i>.....</i>	59

4.1.6	PCR para detecção de <i>U. urealyticum</i>	60
4.1.7	PCR para detecção de <i>U. parvum</i>	61
4.1.8	PCR para detecção de sorotipos de <i>U. parvum</i>	62
4.1.9	PCR para detecção de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	63
4.1.10	PCR para detecção de <i>Gardnerella vaginalis</i>	64
4.1.11	PCR para detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i>	65
4.1.12	PCR para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i>	65
4.1.13	qPCR para <i>Ureaplasma urealyticum</i>	66
4.1.14	qPCR para <i>U. parvum</i>	67
4.1.15	Análise dos dados obtidos nas qPCR para <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>	68
4.1.16	Detecção de HPV nas amostras.....	69
4.2	Estudo das alterações de queratinócitos primários humanos (PHK) após infecção por ureaplasmas	71
4.2.1	Cultivo de ureaplasmas	71
4.2.2	Cultura de células	72
4.2.3	Curva de crescimento.....	73
4.2.4	Dosagem de citocinas no sobrenadante das células.....	73
4.3	Análise Estatística	74
5	RESULTADOS	75
5.1	Avaliação da presença de <i>Ureaplasma spp.</i> e outros microrganismos de interesse clínico na cérvix de mulheres com e sem lesão cervical	75
5.2	Estudo das alterações de queratinócitos primários humanos (PHK) após infecção por ureaplasmas	86
5.2.1	Curva de crescimento.....	86
5.2.2	Dosagem de citocinas.....	87
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS.....	104
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	117
	APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO.....	121

1 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência do câncer no século XXI, bem como de outras doenças crônicas não transmissíveis, tem caracterizado um novo perfil epidemiológico mundial, e atenção especial das instituições de saúde pública. De acordo com as estimativas globais do projeto GLOBOCAN, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), coordenada pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), mostram que, em 2012, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo (WHO, 2013; INCA, 2014). O câncer cervical é o quarto mais comum entre mulheres e o sétimo em geral, sendo sua maior incidência em regiões menos desenvolvidas. Em 2012, detectou-se 528 mil novos casos e aproximadamente 266 mil mortes em no mundo, respondendo por 7,5% de todas as mortes por câncer do sexo feminino (IARC, 2012a). No Brasil, esperam-se 15.590 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de aproximadamente 15 casos a cada 100 mil mulheres em 2014 (IARC, 2012b; INCA, 2014). Na região Nordeste, o câncer de colo de útero ocupa a segunda posição (18,79/100 mil) e somente na Bahia foram estimados 1.300 novos casos para 2014, com taxa bruta de 16,78 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

O câncer de colo de útero pode ser caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, que pode comprometer o tecido subjacente (estroma) (BRASIL, 2006). Se não for tratado, as células alteradas podem invadir todas as suas estruturas e órgãos adjacentes ou distantes. O desenvolvimento da doença é lento e precedido por lesões denominadas de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) que variam em intensidades de I a III. Inicialmente a doença é assintomática, mas evolui para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual. Ocorre secreção vaginal anormal e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados. O desenvolvimento das lesões depende da exposição ao Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco, tais como HPV-16 e HPV-18. A presença do vírus está relacionada como um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical. Isso porque, durante a infecção, tais vírus produzem oncoproteínas (tais como

E6 e E7) que irão interagir com a maquinaria celular causando diversas alterações, como transformação e imortalização celular. Somada a isto, a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro bem como a carga viral, são descritos como fatores colaboradores ao processo de carcinogênese (CLIFFORD et al., 2003; LUKIC et al., 2006; SCHIFFMAN; CLIFFORD; BUONAGURO, 2009; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; ZUR HAUSEN, 2009).

Como os outros tipos de câncer, o desenvolvimento do câncer cervical é multifatorial. Dessa forma, apenas a presença do vírus não é suficiente para o desenvolvimento da doença, dependendo de outros fatores de risco tais como uso de contraceptivos orais, o estado imunológico e nutricional do indivíduo, início precoce da vida sexual, a multiplicidade de parceiros e até mesmo a coinfeção com outros microrganismos (BORNSTEIN; RAHAT; ABRAMOVICI, 1995; BOSCH et al., 2002; CASTLE et al., 2001; CASTLE; GIULIANO, 2003; CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002; IARC-MONOGRAPHS, 2012; ZUR HAUSEN, 2009).

Apesar de *Chlamydia trachomatis* ser o agente infeccioso descrito com maior evidência de correlação com o HPV, devido a resposta inflamatória gerada no colo do útero e pelos danos genotóxicos causados, a associação com outros agentes sexualmente transmissíveis acaba dificultando o estabelecimento de uma relação causal fidedigna. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) os danos genotóxicos associados com a resposta inflamatória local é um mecanismo provável de interação entre o HPV e outros agentes infecciosos, que justificam em parte a persistência e progressão da doença (IARC-Monographs, 2012). Neste contexto incluem-se espécies de micoplasmas, os quais têm sido descritos como principais causadores de diversos distúrbios genitais, tais como as uretrites não gonocócicas e não clamidiais (UNG-NC), e em casos de vaginose bacteriana (VB). Tais microrganismos são capazes de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL1, IL-6 e TNF- α , e quimiocinas. O recrutamento de células da resposta imune para o local da infecção causa intensa inflamação. Esta resposta tem sido associada como um possível fator de risco para desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (CASSELL et al., 1993; EKIEL et al., 2009; GUIJON et al., 1992; HARADA et al., 2008; MCGOWIN POPOV; PYLES, 2009;

REYES et al., 2006; TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011). A associação de fatores a uma determinada doença quase sempre requer mais evidências, e o câncer cervical é um tema que necessita de maiores esclarecimentos quanto ao seu desenvolvimento. Dessa forma, o estudo da coinfeção dos micoplasmas e o HPV na região cervical poderá contribuir para o estabelecimento de mais um fator de risco para o surgimento das transformações que darão origem às lesões cervicais.

Micoplasma ainda é um termo genérico relacionado aos microrganismos pertencentes à classe *Mollicutes*, os quais possuem características peculiares em relação às demais bactérias. Estas bactérias são naturalmente desprovidas de parede celular, possuem um genoma reduzido e são nutricionalmente exigentes (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Existem quatro ordens, sete famílias e 11 gêneros. Dentre os gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma* encontram-se as principais espécies desta classe que habitam animais e humanos, que podem atuar como oportunistas ou patógenos (MARQUES et al., 2010; SOUZA et al., 2007;). A virulência de cada espécie depende das enzimas do metabolismo e de seus produtos (MANILOFF et al., 1992; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

Ao gênero *Ureaplasma*, juntamente com *Mycoplasma*, pertencem as principais bactérias da classe *Mollicutes* descritas como causadoras de doenças. Os ureaplasma diferem das outras 200 espécies principalmente por possuírem urease, uma enzima que hidrolisa a ureia para obtenção de ATP, produzindo amônia, íons amônia e CO₂, compostos tóxicos para as células do hospedeiro. Na região genital podem aumentar o pH local e permitir a colonização por outras bactérias (POLLACK, 2001). Algumas espécies aderem, invadem ou fundem-se com células através de rearranjos cromossômicos os quais ajudam estes microrganismos a escapar do sistema imune do hospedeiro e da ação de antibióticos. Este contexto contribui no aumento do seu potencial em causar doenças (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; SOUZA et al., 2007). Embora os ureaplasmas sejam muitas vezes descritos como comensais, ou seja, sem causar sintomas em indivíduos saudáveis, têm sido descritos como possíveis causadores de diversas patologias. Incluem-se as UNG-NC, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade, adversidades na gravidez, corioamnionite e displasia broncopulmonar em

recém-nascidos (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). O desenvolvimento de um estudo “in vitro”, com a finalidade de observar os efeitos inflamatórios causados pela infecção por *Ureaplasma* spp. isoladamente e em associação com as proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco (HPV-16), em conjunto com a detecção desses microrganismos no material clínico de mulheres com lesão cervical, poderão contribuir para o melhor entendimento do processo de carcinogênese do câncer cervical.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As lesões e o câncer cervical

Uma das primeiras descrições de lesões no colo do útero foi realizada pelo Dr. George Papanicolaou (THOMS, 1943). Ao observar alterações sugestivas de uma doença do colo do útero, criou uma nomenclatura que objetivava expressar alterações celulares atribuindo-lhes uma classificação, dividida em classes I, II, III, IV e V, com a classe I indicando ausência de células atípicas ou anormais até a classe V indicando citologia conclusiva de malignidade. Entretanto, tal classificação não levava em consideração alterações histológicas. Com o conhecimento progressivo sobre a doença, levantaram-se diversos questionamentos a respeito do sistema de nomenclaturas adotado, o qual não abrangia com sucesso os aspectos histológicos das lesões. Na tentativa de melhorar a correlação cito-histológica, outras classificações foram adotadas, sendo incluída a terminologia Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) subdividida em três graus, que se mantém para os diagnósticos histológicos (BRASIL, 2006). O Sistema Bethesda (Maryland, Estados Unidos), é o sistema de classificação do esfregaço cervical mais atual (BRASIL, 2012; SOLOMON et al., 2002).

Seguindo os conceitos do Sistema Bethesda, o Ministério da Saúde, por meio do Instituto Nacional do Câncer (INCA), desenvolveu um manual denominado Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais, que contribuiu para melhorar a padronização dos laudos provenientes dos exames citológicos e permitiu a comparação dos relatórios de citologia cérvico-vaginal entre os diversos centros de serviço no Brasil e no mundo. Dessa forma, o diagnóstico citológico deve ser diferenciado tanto para células escamosas e glandulares em casos de atipias, acompanhado dos comentários: “possivelmente não neoplásicas”, quando não forem encontradas alterações sugestivas de malignidade, e “não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau”, caso sejam observadas alterações sugestivas de malignidade. É desaconselhado o uso dos acrônimos ASCUS (células escamosas atípicas de significado desconhecido) e AGUS (células glandulares atípicas de significado desconhecido), devendo constar as

observações por extenso para evitar possíveis confusões nos relatórios. Em caso de constatação de lesões em células escamosas, foram adotados os termos lesão intraepitelial de baixo grau - LSIL (compreendendo efeito citopático pelo HPV e NIC grau I), lesão intraepitelial de alto grau - HSIL (compreendendo NIC graus II e III), lesão intraepitelial de alto grau, não podendo excluir microinvasão e, por fim, carcinoma epidermóide invasor. Para lesões em células glandulares deve-se usar os termos adenocarcinoma “in situ” (AIS) e adenocarcinoma invasor, especificando se é cervical ou endometrial. Além disso, deve ser realizado o diagnóstico citomorfológico sugestivo da infecção por HPV (BRASIL, 2012; LUKIC et al., 2006).

A evolução para o câncer ocorre de forma lenta. Seu pico de incidência encontra-se entre mulheres de 40 a 60 anos de idade, e em raros casos entre aquelas com menos de 30 anos. Devido ao fato de ser uma doença que transcorre por longo período de fase pré-clínica, é o tipo de câncer que apresenta entre os mais altos potenciais de prevenção pelo diagnóstico simples e tratamento das lesões. O carcinoma de células escamosas representa cerca de 85% a 90% dos casos de câncer do colo do útero, seguido pelo tipo adenocarcinoma. O principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras é a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV). Entretanto, apenas a presença do vírus não representa uma causa suficiente para o surgimento da neoplasia, fazendo-se necessário sua persistência e a ação conjunta com outros fatores de risco (MS/INCA, 2002; INCA, 2014).

2.2 O Papiloma Vírus Humano (HPV) e o câncer cervical

2.2.1 Histórico

A presença de verrugas genitais e cutâneas são descritas desde a antiguidade, as quais eram associadas às práticas sexuais promíscuas. Joseph F. Payne, em 1891, foi um dos primeiros pesquisadores a compreender a natureza infecciosa das verrugas, ao observar o crescimento de verrugas em seu próprio polegar após inoculação com raspado da superfície da verruga de uma criança. Em 1907 na Itália, Ciuffo foi capaz de

associar a natureza infecciosa das verrugas a um vírus, ao realizar uma inoculação na sua própria mão com um filtrado de verrugas maceradas que tinha sido passado através de um filtro com porosidade onde só era possível a passagem de partículas com dimensões tais como os vírus, mas a demonstração da real presença de partículas virais foi feita por Strauss et al. em 1949 e 1950 por meio de estudos utilizando microscopia eletrônica (STRAUSS et al., 1949; STRAUSS; BUNTING; MELNICK, 1950). A partir de então, a discussão seria a respeito da “teoria unitária”, que visava estabelecer uma associação causal entre o surgimento de verrugas cutâneas e genitais pelo mesmo agente viral (GARFIELD, 1988; IARC, 2007; ORIEL, 1971). Estudos mais aprofundados relacionados a verrugas humanas e seus agentes causais só ocorreram anos depois, com a ascensão de outras quatro ramificações de linhas de pesquisa preliminares: (a) estudos sobre o desenvolvimento de papilomas em bovinos; (b) estudos sobre o desenvolvimento de papilomas em coelhos; (c) estudos sobre uma rara condição hereditária em humanos denominada de epidermodisplasia verruciforme ou doença de Lewandowsky-Lutz; e (d) as investigações sobre a etiologia viral de câncer do colo do útero (IARC, 2007) .

Esta última tornou-se fundamental para o entendimento do HPV como agente causal do câncer cervical. Diversos relatos descreviam os tipos de HPV envolvidos em lesões de pele e de mucosas a partir da década de 1970. Dessa forma, priorizaram-se estudos para compreender a possível relação entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical (ZUR HAUSEN et al., 1974, 1975, 1976, 1977, 2002). Gissmann et al. (1983) demonstraram que sequências do DNA de HPV-6 ou HPV-11 eram encontradas em casos de *condyloma acuminata*, e não em carcinomas cervicais. Contudo outras sequências relacionadas, mas não idênticas àquelas estavam presentes nos casos de câncer. Sequências isoladas de biópsias provenientes de carcinoma cervical foram posteriormente utilizadas em experimentos de hibridização com baixas condições de stringência (concentração de sais, pH, temperatura, conteúdo GC da sonda, etc.) e depois clonadas, purificadas e testadas com materiais clínicos variados. Verificou-se em seguida que se tratavam de novos tipos de HPV, o HPV 16 (DÜRST et al., 1983) e o HPV 18 (BOSHART et al., 1984). Para ser estabelecida a relação causal entre o HPV e o

câncer cervical, foram realizadas diversas investigações nos mais diversificados campos do conhecimento. A presença dos genes E6 e E7 dos vírus, bem como o processo de integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, foram caracterizados como responsáveis pelo processo de imortalização e possível transformação celular (DYSON et al., 1989; SCHEFFNER et al., 1990; SCHWARZ et al., 1985). Associados a estes estudos, o seguimento de grandes estudos epidemiológicos ao redor do mundo foi fundamental para ser estabelecida a presença do HPV como fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical (BOSCH et al., 2002; ELUF-NETO et al., 1994; FRANCO et al., 1999; MUÑOZ et al., 1992, 2003).

2.2.2 Taxonomia

Os papillomavírus eram agrupados em uma única família, a *Papovaviridae*, em conjunto com os poliomavírus. Essa classificação foi apresentada devido a algumas similaridades entre os vírus, tais como a ausência de envoltório e DNA dupla fita. Posteriormente verificou-se diferenças no tamanho, na organização dos genomas e sequências de nucleotídeos. Dessa forma, de acordo Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*), a família *Papovaviridae* foi dividida em duas novas famílias distintas: *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae* (VAN REGENMORTEL et al., 2000; DE VILLIERS et al., 2004).

A classificação dos papilomavírus (PV) é baseada em análises filogenéticas da ORF L1, que é a região mais conservada entre as diferentes espécies, sendo também utilizada para a identificação de novos tipos de PVs. Além disso, comparações entre sequências L1 permitiram a classificação em gênero, espécie e tipo. A divisão em gêneros diferentes ocorre quando há menos de 60% de identidade das sequências nucleotídicas. Os membros de uma mesma espécie e mesmo tipo compartilham entre si de 60% a 70% e 71 e 89%, respectivamente, de identidade das sequências nucleotídicas. Os gêneros de papilomavírus são denominados por uma letra grega e as espécies pela adição de um número após cada gênero. A última classificação oficial de PVs terminava na letra grega “Pi” (DE VILLIERS et al., 2004). A descrição de 13 novos gêneros de PV proposto por

BERNARD et al. (2010) esgota o alfabeto grego. Para a criação de um sistema que continuasse seguindo esse sistema, foi proposto novamente o uso do alfabeto grego com o prefixo "dyo" (em grego, "uma segunda vez") e ocultando de "Alpha", "Beta" e "Gamma" por serem os gêneros com espécies mais comumente isoladas e de maior interesse clínico para humanos (BERNARD et al., 2010; BERNARD, 2013).

Bernard et al. (2010) classificaram os papilomavírus em mais de 30 gêneros, 70 espécies e mais de 189 tipos (Figura 1) contra apenas 16 gêneros, 44 espécies e 118 tipos descritos por de Villiers et al. (2004). Apesar disso, novas espécies foram descritas e publicadas após o 8º *Report* feito pelo ICTV. Desta maneira, existem no momento 39 gêneros, 95 espécies e 271 tipos de papilomavírus, sendo que 160 tipos foram isolados de humanos. A árvore filogenética que representa esses novos dados está na figura 2 ([ICTV Official Taxonomy: Updates since the 8th Report](#)).

Os HPVs podem ser classificados de acordo com sua capacidade de gerar neoplasias, enquadrando-se em HPV de baixo e alto risco oncogênico. Os de baixo risco (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) estão relacionados com o desenvolvimento de verrugas e lesões de baixo grau. Os de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) são associados com o câncer cervical (IARC, 2007).

Figura 1 – Árvore filogenética contendo gêneros e espécies de papilomavírus.

Legenda: Os símbolos semi-circulares mais externos identificam o gênero do papilomavírus. Os símbolos semi-circulares internos identificam a espécie do papilomavírus.

Fonte: Adaptado de BERNARD, 2013.

Figura 2 – Árvore filogenética contendo gêneros e espécies de papilomavírus. Nova classificação.

Legenda: Os símbolos semi-circulares mais externos identificam o gênero do papilomavírus. Os símbolos semi- circulares internos identificam a espécie do papilomavírus. Adição de 9 gêneros e 26 espécies.

Fonte: Adaptado do ICTV ([ICTV Official Taxonomy: Updates since the 8th Report](#)).

2.2.3 Organização Genômica

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é um vírus de 52 - 55 nm de diâmetro, possui DNA circular de duplo filamento com cerca de 8000 pb ligado a histonas celulares. O genoma é envolvido com as histonas H2a, H2b, H3 e H4 formando um complexo contido no capsídeo, que apresenta simetria icosaédrica e é composto por 72 capsômeros pentaméricos (BAKER et al., 1991; CHEN et al., 2000). Possui oito fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs) e uma região não codificadora LCR (*Long Control Region*), com elementos regulatórios e sítios de ligações para fatores de transcrição viral. As ORFs podem ser divididas em precoces (E-*early*) e tardias (L-*late*). As precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam proteínas não estruturais, e as tardias (L1 e L2) codificam as proteínas do capsídeo (FEHRMANN; LAIMINS, 2003).

2.2.4 Replicação viral e transformação celular

O ciclo de infecção dos papilomavírus é dependente da diferenciação celular dos queratinócitos, ou seja, da diferenciação de um epitélio estratificado (Figura 3). No epitélio sem infecção, as células filhas geradas na camada basal param a divisão e se diferenciam, produzindo queratina. Nas camadas mais externas as células perdem a atividade metabólica. As células da camada basal, infectadas com HPV, não param a divisão pela ação das proteínas virais para permitir a replicação viral (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). Entretanto, quando as células epiteliais começam a se diferenciar, a região promotora tardia é ativada levando à expressão de genes tardios, aumentando a replicação do genoma dos vírus. Em camadas mais superiores, os genomas são contidos nos capsídeos finalizando a formação viral com potencial de infectar novas células (HEBNER; LAIMINS, 2006).

Figura 3 – Principais etapas do ciclo de vida do HPV. Epitélio cervical escamoso estratificado e a expressão das proteínas do HPV após a infecção.

Legenda: Células filhas provenientes de células-tronco epiteliais se dividem ao longo da membrana basal e depois amadurecem verticalmente sem a ocorrência de novas divisões (lado direito). Após a infecção do HPV em células-tronco na camada basal do epitélio, a expressão de proteínas não estruturais virais é iniciada. Sob a regulação destas proteínas, a população de células se expande verticalmente e diferenciação de células epiteliais é retardada e não ocorre de maneira completa. As proteínas virais são expressas sequencialmente ao longo da diferenciação das células, e os vírions maduros são produzidos apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. Células apresentadoras de antígenos (APCs) intraepiteliais estão diminuídas no epitélio infectado com o HPV.

Fonte: Adaptado de FRAZER, 2004.

O processo de infecção inicia-se pelas microlesões na camada basal, que ocorrem na atividade sexual (FRAZER, 2004; MCMURRAY et al., 2001). Os receptores envolvidos no reconhecimento vírus/célula são pouco conhecidos. Após o reconhecimento, ocorre a internalização do vírus. A internalização de alguns tipos de HPVs, como o HPV-16, ocorre por endocitose via clatrina. Em seguida, ocorre o desnudamento do capsídeo viral, e exposição do genoma e transferência do DNA viral para o núcleo celular com auxílio da proteína L2 (DOORBAR, 2006). Dentro do núcleo, o genoma viral permanece nas células da camada basal, em forma epissomal, com ativação do promotor de transcrição dos genes precoces (E1, E2, E4 e E5). Cerca de 50 a 100 cópias do genoma viral distribuem-se por célula hospedeira e ocorre infecção persistente (MCMURRAY et al., 2001).

As proteínas expressas precocemente contribuem distintamente para a replicação viral e para a formação de novos vírus. A proteína E1 favorece a manutenção do genoma viral na forma epissomal. A proteína E2 possui diversas funções. Além de contribuir com E1 aumentando sua afinidade ao seu sítio promotor, age segregando de forma igualitária o DNA viral replicado entre as células do hospedeiro no momento da divisão celular, e tem papel fundamental como fator de transcrição na regulação do promotor viral precoce, controlando assim a expressão dos oncogenes E6 e E7 (DOORBAR, 2006). A função da proteína E4 não está bem elucidada, e parece estar equivocadamente classificada como precoce. Isso porque é detectada somente nas camadas mais diferenciadas do epitélio e seu papel está relacionado principalmente à maturação e liberação das partículas virais. A proteína E5 em HPV não tem atividade transformante, e está em abundância no complexo de Golgi. Atua inibindo o processamento pH-dependente de peptídeos antigênicos (FRAZER, 2004; ZUR HAUSEN, 1996).

As proteínas E6 e E7 são as principais proteínas transformantes dos HPVs de alto risco, atuando sobre proteínas que regulam o ciclo celular. Durante o ciclo de vida viral normal, a expressão de E6 e E7 é regulada pela proteína E2. No entanto, nas lesões cancerosas, o genoma viral encontra-se frequentemente integrado ao DNA da célula, podendo se inserir em locais aleatórios ou em sítios frágeis comuns (CFS), as quais são regiões de alta instabilidade genômica. As integrações mais comumente encontradas em

lesões cancerosas ocorrem com interrupções no gene E2 viral. Isso acaba eliminando o controle transcricional mediado por E2 resultando num aumento de produção das oncoproteínas E6 e E7. Diversas funções têm sido descritas para as proteínas E6 e E7. A proteína E6 liga-se à p53, acelerando sua degradação proteolítica, impedindo a parada nos pontos de checagem do ciclo celular ou encaminhamento da célula para apoptose. Além disso, tem a capacidade de ativar a subunidade catalítica da telomerase (hTERT), interrompendo o processo de senescência das células. A proteína E7 é capaz de ligar-se à proteína supressora de tumor pRb, inativando-a. As proteínas Rb são as principais reguladoras do ciclo celular. Na forma hipofosforilada, Rb controla a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular por meio da ligação de E2F. Em células normais, a fosforilação de Rb por complexos de ciclina-quinase conduz à liberação de E2F e, por consequência, a transcrição de genes da fase S. E7 pode substituir esse controle normal do ciclo celular por meio da ligação e degradação de Rb, libertando a ação E2F continuamente. Além disso, células que expressam E7 possuem números anormais de centrôssomas, levando a formação de tetrassomias e causando total instabilidade genômica nas células. Todos esses eventos reunidos têm sido suficientes para o processo de immortalização das células (FEHRMANN; LAIMINS, 2003; HEBNER; LAIMINS, 2006).

2.2.5 Resposta imune e o HPV

A pele atua como a primeira linha de defesa contra uma infinidade de microrganismos patogênicos. As células epiteliais contribuem na liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como fatores de crescimento e quimiocinas. As citocinas incluem o fator de crescimento β (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), que são produzidos também por outros tipos celulares. Contudo, apenas essa barreira não é suficiente para conter a infecção por patógenos tais como àquelas causadas pelo HPV. A resposta imune adquirida é mediada pela combinação de mecanismos humorais (anticorpos) e celulares. A resposta imune mediada por células é coordenada pela ação de diversas citocinas presentes, tais como TNF- α , IL-1, IL-6,

interferons, entre outras, produzidas em diversas etapas da resposta imune. Essas citocinas podem ser liberadas por uma variedade de tipos celulares, como linfócitos T, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células *natural killers* (NK). A ação conjunta entre as citocinas bem como das células ativadas contribuem na contenção das infecções virais (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004). TGF- β e TNF- α são descritos como potentes inibidores da proliferação de queratinócitos, desempenhando um papel importante no controle do crescimento dessas células. Além disso, a atividade antitumoral e antiproliferativa de TNF- α pode ser um evento importante na regressão de lesões e tumores induzidos pela infecção persistente por HPV (KYO et al., 1994; WOODWORTH; NOTARIO; DIPAOLO, 1990).

O HPV possui diversos mecanismos para evadir à resposta imune. Sua necessidade em utilizar a maquinaria celular, como quaisquer vírus, os obriga a habitar no meio intracelular, tornando-os inacessíveis às células de defesa. Dessa forma, a ação de anticorpos contribui no controle inicial da infecção, impedindo sua entrada na célula hospedeira, atuando também após a liberação das partículas virais das células hospedeiras. Como a infecção por HPV não tem característica citolíticas, não ocorre o recrutamento de uma resposta inflamatória satisfatória. Além disso, proteínas do HPV podem atuar desregulando fatores relacionados à montagem da resposta imune. Pode fazer isso atuando sobre a maquinaria de processamento de peptídeos, os quais são reconhecidos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC), bem como reprimindo a expressão da cadeia pesada de MHC de classe 1, impedindo a montagem de uma resposta imune eficiente (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007). Também pode atuar interferindo com as atividades antiproliferativas e antitumorais de TNF- α , sendo que essa resistência pode ser considerada como papel chave na patogênese do HPV no câncer cervical. Além de TNF- α , as atividades de IL-1 e IL-6 também estão alteradas durante a infecção por HPV, podendo contribuir com a proliferação das células tumorais (BOCCARDO et al., 2004, 2010).

2.2.6 História natural e Fatores de risco

Os principais passos necessários para a carcinogênese cervical incluem a infecção inicial por HPV, a persistência da infecção, progressão de lesões pré-cancerosas e, eventualmente, invasão no tecido. Desde que não haja invasão, o processo pode ser reversível. Isso porque infecções subclínicas geralmente podem ser auto resolutivas, com o vírus sendo erradicado ou suprimido a níveis não detectáveis. A infecção, tanto por HPVs de alto risco como pelos de baixo risco, pode causar LSIL na cérvix uterina. LSIL parece ser uma manifestação transitória da infecção viral produtiva, onde o epitélio infectado por HPV passa pela diferenciação e maturação e exibe apenas pequenas anormalidades celulares. No entanto, as lesões cervicais classificadas como HSIL, carcinoma *in situ* ou câncer invasivo são causadas por HPVs de alto risco. HPV 16 e HPV 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervicais invasivos (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; CARTER; DING; ROSE, 2011; IARC, 2007; MUÑOZ et al., 2003).

Apesar de ser uma causa necessária, apenas a presença do vírus não é suficiente para o processo de carcinogênese. Muñoz et al. (2006) relacionaram alguns outros fatores provavelmente envolvidos no desenvolvimento da doença:

- 1) Cofatores virais, como infecção por tipos específicos de HPV, coinfeção com outros tipos de HPV ou suas variantes, carga viral e integração viral;
- 2) Cofatores do hospedeiro, incluindo hormônios endógenos, fatores genéticos e sistema imune;
- 3) Cofatores ambientais ou exógenos, incluindo o uso de contraceptivos hormonais, tabagismo, número de partos, número de parceiros e co-infecções com outros agentes sexualmente transmissíveis;

O estudo de cofatores, principalmente aqueles relacionados a outros agentes sexualmente transmissíveis, tem sido difícil porque muitas das exposições envolvidas estão correlacionadas com o comportamento sexual e, portanto, com a infecção por HPV. Análises restritas a indivíduos HPV-positivos têm sido consideradas a melhor alternativa

analítica para o controle desse tipo de confusão. Alguns agentes, tais como *Chlamydia trachomatis* e herpes simplex vírus, assim como a inflamação associada a alguns agentes, têm sido mostrados como fatores relacionados ao risco de câncer do colo do útero, uma vez que inflamação do colo do útero pode levar a danos genotóxicos, atuando como um mecanismo provável para a interação entre o HPV e esses agentes infecciosos (CASTLE; GIULIANO, 2003; IARC, 2007; IARC-Monographs, 2012). Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para a compreensão desses possíveis agentes bem como do processo inflamatório envolvido, e sua associação com a infecção viral no processo de carcinogênese.

2.3 Classe Mollicutes

2.3.1 Histórico

O primeiro isolamento de *Mollicutes* foi realizado em 1898 por Nocard. Esses isolados (posteriormente conhecidos como *M. mycoides*) foram obtidos de gado diagnosticado com pleuropneumonia bovina contagiosa (CBPP). A partir de então, bactérias isoladas com características similares passaram a ser chamadas de “organismos pleuropneumonia-like” (PPLO) (BOVÉ, 1999; DIENES; EDSALL, 1937; NOCARD, 1990; RAZIN; HAYFLICK, 2010). Em humanos, o primeiro isolamento (*M. hominis*) foi realizado em 1937 por Dienes e Edsall, obtido de um abscesso formado na glândula de Bertolini de um paciente. Pelas observações realizadas por Klieneberger, esses microrganismos se enquadravam como L-forma 3 (L3). Eram muito frágeis, suas formas poderiam ser vistas apenas por meio de técnicas especiais, possuíam características similares aos PPLO animais e proporcionavam doenças com características similares às virais (DIENES, 1939; KLIENEBERGER, 1938; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Atualmente, tais classificações não são mais utilizadas. Os termos “mycoplasma” (mais difundido na língua inglesa) ou “micoplasma” são os mais difundidos, e são usados informalmente quando se trata a respeito de bactérias pertencentes à classe *Mollicutes* (*mollis* = mole, flexível e *cútis*= pele, em latim) (RAZIN;

YOGEV; NAOT, 1998). Entretanto, *Mycoplasma* se refere apenas a um dos 11 gêneros descritos.

2.3.2 Taxonomia

Mollicutes é a única classe do filo *Tenericutes*. Anteriormente, *Mollicutes* era classificado dentro do filo *Firmicutes*. Essa mudança é justificada, em parte, pela análise de uma série de marcadores filogenéticos conservados, incluindo a subunidade B da RNA-polimerase, a chaperonina GroEL, diferentes aminoacil tRNA sintetases, e subunidades de F0F1-ATPase. Esta classificação é ainda apoiada pela ausência de parede celular, característica desses microrganismos. As sequências do gene 16S rRNA contribuem para sua classificação em grupos filogenéticos, sendo essa sequência obrigatória para a caracterização de novas espécies. Além disso, a atribuição de espécie aos grupos é feita principalmente por hibridação DNA-DNA, sorologia e semelhança na sequência do gene 16rRNA. Algumas espécies foram atribuídas individualmente a grupos filogenéticos, clusters, e subclusters que também compartilham outras características (BERGEY's, 2010; BROWN, WHITCOMB & BRADBURY, 2007; WEISBURG et al., 1989)

A classe é composta por quatro ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*), sete famílias (*Mycoplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Mycoplasmatales*), *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Acholeplasmatales*) e *Anaeroplasmataceae*), 11 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Phytoplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*) e mais de 200 espécies. A família *Mycoplasmataceae* contém os principais microrganismos de interesse médico, dentre os quais estão os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Enquanto *Ureaplasma* possui sua base filogenética bem definida pela sequência dos genes de rRNA, *Mycoplasma* é encontrado em pelo menos três linhagens filogenéticas ou grupos. O primeiro grupo é o “tipo espécie”, que contém *Mycoplasma mycoides* (além de *capricolum*, *cottewii*,

putrefaciens e *yeatsii*), que na verdade é mais estreitamente relacionada com o gênero *Entomoplasma* da ordem *Entomoplasmatales*, do que para a maioria das outras espécies de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. O segundo grupo, chamado de "grupo *pneumoniae*", inclui tanto o gênero *Ureaplasma* como quatro *clusters* de *Mycoplasma* (*clusters* “*fastidiosum*”, “*hemotrophic*”, “*muris*” e “*pneumoniae*”). O terceiro grupo, chamado de "grupo *hominis*", inclui os oito *clusters* restantes de *Mycoplasma* “*bovis*” (*clusters* “*equigenitalium*”, “*hominis*”, “*lipophilum*”, “*neurolyticum*”, “*pulmonis*”, “*sualvi*” e “*synoviae*”) (Figura 4) (BERGEY's, 2010; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998;).

Estudos demonstram que os organismos atribuídos aos gêneros *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Acholeplasma* surgiram por evolução redutiva como um ramo da linhagem de *Clostridium* (Gram-positivo), que ficava perto de *Bacillus* e *Lactobacillus*. Isso pode ser explicado pelo baixo conteúdo G+C e por compartilhar com estreptococos e bactérias ácido-lácticas enzimas com atividades semelhantes. O evento inicial na filogenia dos *Mollicutes* foi a formação do ramo *Acholeplasma*; assim, a perda de parede celular provavelmente ocorreu com redução do genoma a aproximadamente 1000 MDa. Um ramo posterior produziu o *Spiroplasma*. Este ramo parece ter sido a origem dos micoplasmas dependentes de esteróis. Durante o desenvolvimento desse ramo, reduções independentes ocorriam, com perdas de 500 MDa cada, o que resultou nas espécies dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Micoplasmas, em especial as espécies com os menores genomas, têm altas taxas de mutação, o que sugere que eles estão em um estado de evolução rápida. Esses dados foram confirmados por estudos de sequências de genes 5S rRNA que incluiu uma série de *acholeplasmas*, *anaeroplasmas*, *micoplasmas*, *ureoplasmas* e *Clostridium innocuum* (ROGERS et al., 1985).

2.3.3 *Biologia*

São procariotos muito pequenos (0,2–0,3 μm), totalmente desprovidos de parede celular, fazendo deles resistentes a antibióticos da classe das penicilinas. A ausência de parede celular contribui para classificá-los como Gram-negativos, mesmo tendo evoluído

de uma linhagem Gram-positiva (WOESE; MANILOFF; ZABLEN, 1980). São delimitados apenas por uma única membrana plasmática, dessa forma são sensíveis à lise por choque osmótico, detergentes e álcoois (RAZIN, 1978). Quanto à forma, são pleomórficos, variando de estruturas esféricas ou em forma de balão para ramificada ou filamentos helicoidais (Figura 5). A replicação ocorre por fissão binária, mas pode ser precedida por uma divisão citoplasmática, que conduz à formação de filamentos multinucleadas. As colônias em meio sólido são muito pequenas (menores que 1 mm de diâmetro). Os organismos tendem a crescer e penetrar no interior do meio sólido. Sob condições adequadas, as colônias têm uma aparência característica de “ovo frito”. A maioria não apresenta motilidade. Possuem baixo conteúdo G+C (23-40%) e usam os códons UGA (*stop codon* universal) e UGG como códons do triptofano, exceto *Acholeplasma laidlawii* (TANAKA; ANDACHI; MUTO, 1991) e os phytoplasmas (TOTH; HARRISON; SEARS, 1994). Possuem pequeno genoma (0,58–2,20 Mb), sendo consideradas as menores e mais simples bactérias auto-replicativas (BOVÉ, 1999). Devido a este fato, são nutricionalmente exigentes, vivendo como parasitas dos mais diversos seres, como mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas. Os habitats principais de micoplasmas humanos e animais são as superfícies mucosas (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003).

Figura 4 – Relações filogenéticas dos grupos de *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma pneumoniae* da ordem *Mycoplasmatales*.

(Continua)

Figura 4 – Relações filogenéticas dos grupos de *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma pneumoniae* da ordem *Mycoplasmatales*.

(Conclusão)

Fonte: Adaptado de BERGEY's et al., 2010.

Figura 5 – Morfologia celular diversa no gênero *Mycoplasma*.

Legenda: Microscopia eletrônica de varredura de (a) *Mycoplasma penetrans*, (b) *Mycoplasma pneumoniae*, (c) " *Mycoplasma insons* ", e (d) *Mycoplasma genitalium*. Barra = 1 mm.

Fonte: Adaptado de BERGEY's et al., 2010.

As principais espécies que parasitam humanos encontram-se nos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, os quais possuem metabolismos distintos. Alguns micoplasmas são fermentadores, produzindo ácidos por meio da metabolização principalmente de glicose, e outros são não-fermentadores pois possuem a via da arginina-deidrolase para obtenção de ATP (BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007; OLSON et al., 1993;). As espécies do gênero *Ureaplasma* requerem ureia para produzir ATP, hidrolisando este composto e produzindo amônia. Como não turvam o meio de cultura como as demais bactérias, seu crescimento é notado à medida que liberam produtos de seu metabolismo, mudando a cor do meio de cultura devido a presença de

um indicador de pH adicionado ao meio de cultura (BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007; POLLACK; WILLIAMS; MCELHANEY, 1997;).

2.3.4 Patogenicidade

Alguns apresentam a capacidade de aderir e/ou invadir células fagocíticas e não-fagocíticas, tais como células epiteliais dos tratos respiratório, urogenital, gastrointestinal, das glândulas mamárias e até mesmo de olhos e articulações (BIERNAT-SUDOLSKA et al., 2011; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998;). A propriedade de invasão de células humanas foi descrita inicialmente para *M. penetrans*, mas outros microrganismos de diferentes gêneros também têm sido descritos (LO et al., 1993; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

A capacidade de aderir e/ou invadir é facilitada primeiramente pelo o alto teor de colesterol na membrana de micoplasmas, contribuindo para que ocorra fusão com as células do hospedeiro. Além disso, alguns microrganismos apresentam uma extensão celular polar, afunilada a um dos pólos, contendo um núcleo eletrodense no citoplasma. Esta estrutura, denominada “tip organelle”, funciona como uma organela de adesão e/ou de invasão, devido a adesinas presentes (BASEMAN et al., 1995; JENSEN; BLOM; LIND, 1994; KRAUSE et al., 1982; ROTTEM, 2003). Outros micoplasmas apresentam bolsas de membrana que se assemelham a poços revestidos por clatrina, onde a adesão e invasão nas células ocorre por um evento mediado por receptores que se assemelha a entrada celular por *Chlamydia* (MERNAUGH et al., 1993; WYRICK et al., 1989). Após invasão, alguns permanecem viáveis em vacúolos (JENSEN; BLOM; LIND, 1994), e outros localizam-se principalmente na região perinuclear (BASEMAN et al., 1995).

A presença de *Mollicutes* na superfície ou no interior das células pode causar diversos danos ao hospedeiro. A adesão pode ser considerada o maior fator de virulência, pois pode interferir tanto com receptores quanto com os mecanismos de transporte celular. Muitas espécies produzem enzimas tais como fosfolipases, nucleases, proteases e fosfatases, que podem alterar ou degradar componentes celulares. Esses eventos podem levar à ativação de cascatas e vias de sinalização (BENDJENNAT et al., 1999; LO et al., 1993; ROSENSHINE; FINLAY, 1993; ROTTEM; NAOT, 1998; WAITES; KATZ;

SCHELONKA, 2005). Além disso, devido a sua limitada capacidade de biossíntese, acabam competindo com as células do hospedeiro por precursores, levando a problemas na divisão e no crescimento celular (ROTTEM; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003). Entretanto, os fatores descritos irão variar de acordo com os gêneros e espécies estudados.

2.3.5 *Indução de citocinas em Mollicutes*

Tornou-se evidente a estimulação do sistema imune hospedeiro pelos micoplasmas, refletida por um aumento da expressão de moléculas de superfície, da proliferação e a diferenciação, bem como aumento das funções efetoras manifestadas pela liberação de diversos mediadores solúveis, que desempenham um papel importante no resultado da interação entre os microrganismos e as células imunológicas do hospedeiro (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Uma característica comum documentada para a maioria dos micoplasmas é a sua capacidade de estimular os macrófagos e monócitos para secretar citocinas pró-inflamatória, que são responsáveis pela resposta inflamatória local e sistêmica. TNF- α é um mediador principal da inflamação, febre, liberação de proteínas de fase aguda, choque séptico, e necrose hemorrágica das células tumorais. Esta citocina é produzida principalmente por fagócitos mononucleares, mas também por células T *helper* (Th), *natural killers* (NK) e outras células não relacionadas diretamente ao sistema imune. Uma vez que a maior parte das atividades de TNF- α se sobrepõem com IL-1 (um dos mediadores da inflamação produzido por fagócitos mononucleares e outras células), estas duas citocinas são discutidas em conjunto. O TNF- α e IL-1 são cofatores importantes na ativação de linfócitos T e B, e promovem a proliferação e diferenciação de linfócitos em células efetoras. Ambas as citocinas regulam positivamente a atividade citocida de macrófagos e células NK e aumentam a atividade metabólica de polimorfonucleares. Ao induzir o aumento da expressão de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), potencializam a apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). As células do sistema imune que são estimuladas por TNF- α e IL-1 expressam maiores níveis de receptores de citocinas, α - e β -quimiocinas

e prostaglandinas. A capacidade do TNF- α e IL-1 em causar um aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, em conjunto com outros fatores, provoca o aumento do recrutamento de leucócitos a locais de inflamação. Além disso, favorecem a necrose local e a destruição do tecido. Apesar de doses elevadas de TNF- α levar a inibição, “in vitro”, da replicação de células progenitoras de medula óssea, tanto o TNF- α e IL-1 estimulam a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Isso estimula a hematopoese “in vivo”, aumentando tanto o conjunto de células a serem estimuladas como a quimiotaxia ao sítio da inflamação. Tais efeitos induzidos por ambas citocinas, em resposta às interações com micoplasmas, podem fornecer uma explicação para a maior parte das manifestações inflamatórias e patológicas observadas em infecções por micoplasmas (KITA et al., 1990; MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; REYES et al., 2006; TAYLOR et al., 2013).

IL-6 é outra citocina pleiotrópica e pró-inflamatória induzida por muitos micoplasmas. Esta citocina é produzida por monócitos e macrófagos, bem como por Th e linfócitos B e outras células não relacionadas diretamente ao sistema imune. IL-6 exibe algumas atividades que se sobrepõem aos do TNF- α e IL-1. No entanto, a sua principal atividade é mediada pela sua capacidade de servir como um cofator na diferenciação de células B e maturação em células secretoras de imunoglobulinas (Ig). A IL-6 também aumenta a expressão de receptor IL-2 (IL-2R) em células ativadas e induz a produção de IL-2 por Th. Isso promove a proliferação de linfócitos T e amplifica a hematopoese. IL-6, assim como TNF- α e IL-1, também desencadeia a produção de proteínas de fase aguda no fígado. É interessante que, exceto por *M. hyopneumoniae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, e *M. salivarium*, todos os micoplasmas que induzem a produção e liberação de IL-6 foram identificados como mitógeno para linfócitos B de ratos (MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; REYES et al., 2006; TAYLOR et al., 2013).

2.3.6 *Ureaplasmas*

A capacidade de metabolizar ureia e o tamanho diminuto das colônias conferem aos ureaplasmas características que os distinguem dos demais *Mollicutes*. Em 1954, Shepard realizou o primeiro isolamento a partir do exsudato da uretra de pacientes com uretrite não-gonocócica (UNG). Esses microrganismos foram denominados de diferentes formas, como “tiny-form PPLO”, “T-form colonies of PPLO” e por fim “T-strain” de mycoplasma (“T” de *tiny* = pequeno). Somente em 1974 foi proposto que se tratava de uma nova espécie, que então ficou conhecida como *Ureaplasma* (isto é, forma que requer ou utiliza ureia) *urealyticum* (isto é, dissolve ou digere ureia) (SHEPARD et al., 1974).

Apresentam-se como células cocóideas com cerca de 500 nm de diâmetro; pode aparecer como formas de coco-bacilo em fase de crescimento exponencial (Figura 6). Não apresentam motilidade e são anaeróbios facultativos. Formam excepcionalmente pequenas colônias em meios sólidos que são descritos como minúsculas colônias "ovo frito" ou como colônias "cabeça de couve-flor", com uma periferia lobulada. Para crescimento exige um pH incomum (cerca de 6,0-6,5). Temperatura de incubação ideal para espécies examinadas é 35-37°C. São quimiorganotróficos, ou seja, necessitam de uma fonte de carbono para seu metabolismo energético. Assim como *Mycoplasma*, espécies de *Ureaplasma* não possuem atividade NADH oxidase. Ao contrário de outros *Mollicutes* não possuem atividades de hexoquinase ou arginina deiminase, não sendo capazes de metabolizar glicose ou arginina. Possui a capacidade de metabolizar a ureia por meio de uma urease, hidrolisando em CO₂ e NH₃ para geração de energia e crescimento. Seu genoma varia de 760-1170 kpb, com conteúdo G+C (mol%) na faixa de 25-32. São comensais ou patógenos oportunistas em hospedeiros vertebrados, principalmente aves e mamíferos (BERGEY's, 2010).

Anteriormente, *Ureaplasma urealyticum* apresentava 14 sorovares com características distintas, as quais foram divididas em 2 biovars ou clusters: a biovar 1 (com os sorotipos 1, 3, 6 e 14) e biovar 2 (também conhecida como T960, com os sorotipos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13), sendo que essa divisão foi estabelecida inicialmente pela susceptibilidade ao manganês (Mn²⁺) (ROBERTSON; CHEN, 1984; ROBERTSON; STEMKE, 1982;). Apesar de diversas tentativas, nenhum método sozinho

era suficiente para a criação de uma classificação adequada. Assim, após a realização de diferentes experimentos, como análises filogenética dos genes 16S rRNA, das regiões de espaçamento 16S-23S rRNA, dos genes das subunidades da urease e dos genes dos antígenos de múltipla banda (MBA) verificou-se a necessidade de reclassificar a biovar 1 como uma nova espécie. Dessa forma, a espécie *Ureaplasma urealyticum* biovar 1 passou a ser conhecida como *Ureaplasma parvum*, e a biovar 2 continuou sendo *Ureaplasma urealyticum*. Em relação à biovar 1 (*U. parvum*), os sorotipos 3 e 14 são agrupados juntos pois são bastante similares, com diferença de apenas três pares de base. Já os sorotipos 1 e 6 possuem diferença de 16 bp (KONG et al., 1999; ROBERTSON et al., 2002; TENG et al., 1994; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

Figura 6 – Tamanho e morfologia celular de *Ureaplasma*.

Legenda: (a) Colônias isoladas de *Ureaplasma urealyticum*, cercando uma única grande colônia de *Mycoplasma hominis* em uma superfície de ágar sólido para micoplasmas. Colônias de *Ureaplasma urealyticum* comumente têm diâmetros de 15-125 mm; o diâmetro da colônia de *Mycoplasma hominis* mostrada é de aproximadamente 0,9 milímetros. (b) Micrografia eletrônica de transmissão de *Ureaplasma urealyticum*, sorotipo 4, cepa 381/74, que mostra células com morfologia cocóide, cápsula extramembranosa coradas com vermelho de rutênio, ausência de parede celular, apenas uma membrana e conteúdos citoplasmáticos aparentemente simples em que apenas ribossomos são evidentes. Diâmetros celulares de 485-585 nm

Fonte: Adaptado de BERGEY's et al., 2010.

Dentre as 14 sorovares descritas, são verificadas variabilidades quanto ao tamanho do genoma, sendo de 760kpb para sorovares pertencentes a biovar 1 e 840-1140kpb para sorovares da biovar 2 (ROBERTSON et al., 1990). Com o sequenciamento da serovar 3 feita por Glass et al. (2000) foi verificado baixo conteúdo G+C (25,5%), o menor dentre os *Mollicutes* e um dos menores entre outras bactérias. Além disso, enzimas altamente conservadas em eubactérias parecem não ser codificadas por ureaplasmas, incluindo a proteína de divisão celular FtsZ, as chaperoninas GroES e GroEL e o ribonucleotídeo difosfato redutase (RDR). Possuem seis transportadores de ferro estreitamente relacionados, sugerindo a presença de sistema de respiração não presente em outras bactérias de genomas pequenos. Além disso, quase toda síntese de ATP é resultado da hidrólise da ureia (GLASS et al., 2000).

A metabolização da ureia é possível devido a presença da enzima urease a qual hidrolisa a ureia em íons amônio e CO₂, gerando um gradiente eletroquímico para produção de energia. Esta via metabólica é responsável por 95% do ATP gerado pela célula; os restantes 5% são gerados pela fosforilação a nível de substrato. Entretanto, são necessárias condições ótimas para obtenção de ATP pela via da urease. Por exemplo, a quantidade de íons fosfato e de ureia são fatores favoráveis, porém o excesso de íons amônio e pH básico podem inibir a reação (GLASS et al., 2000; SMITH et al., 1993).

A ligeira acidez da mucosa genital contribui para o desenvolvimento de ureaplasmas. Neste sítio anatômico, produzem amônia, aumentando o pH genital e facilitando a colonização de outros microrganismos que são sensíveis ao pH ácido natural (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). *U. parvum* sorovar 3 é mais frequentemente isolado do que *U. urealyticum* (CASSELL et al., 1993; GLASS et al., 2000). No entanto, em alguns indivíduos, ambos podem estar presentes (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). *U. urealyticum* está entre os principais microrganismos responsáveis pelo estabelecimento de uretrites não-gonocócicas e não clamidiais (CASSELL et al., 1993). Pode causar gravidez anormal pela indução de vaginose bacteriana, cervicite, infecção intrauterina, pneumonia neonatal e pré-eclâmpsia (CASSELL et al., 1993; PADMINI; UTHRA, 2012).

Embora ureaplasmas sejam um dos mais significativos mollicutes patogênicos em seres humanos, o seu estudo é limitado pela dificuldade de obtenção de um rendimento

satisfatório em cultura de ureaplasmas. Cinco proteínas de *Ureaplasma* spp. foram inicialmente identificadas como possíveis fatores de virulência: urease, imunoglobulina A protease (IgA), o antígeno MBA (*multiple-banded antigen*), e fosfolipases C e A. Além disso, a presença de cápsula tem sido descrita para *Ureaplasma* spp. No entanto a virulência desses fatores ainda é incerta, pela dificuldade de modelos animais para o estudo de patogenicidade (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Analisando a frequência da associação de *U. urealyticum* e *U. parvum* nos distúrbios urogenitais, alguns estudos demonstraram que estes agentes podem interferir indiretamente no desenvolvimento de lesões cervicais permitindo a persistência das infecções por HPV. Desta maneira ocorreria o início das anormalidades virais, que paralelamente à liberação dos metabólitos do conjunto infeccioso, levaria ao aumento da inflamação tecidual (BIERNAT-SUDOLSKA et al., 2011; BORNSTEIN; RAHAT; ABRAMOVICI, 1995; LUKIC et al., 2006). Além disso, *U. urealyticum* foi descrito como causador de danos cromossomais em cultura de células linfocíticas, entretanto esse efeito ainda não está bem esclarecido (KUNDSIN et al., 1971). Verteramo et al. (2009) observaram a elevada associação entre a presença de *U. urealyticum* com a infecção por HPV em pacientes com lesões cervicais. Lukic et al. (2006) analisaram 239 mulheres com anormalidades no exame citológico. *U. urealyticum* foi detectado em 27% com diagnóstico para ASCUS, 35% para LSIL e 45% for HSIL, contra 19% para o grupo controle. Evidenciou-se a elevada associação entre as infecções por *U. urealyticum* e HPV.

Ramirez-Salazar et al. (2011) e Mood e Laimins (2010) observaram que proteínas do HPV estão envolvidas nas alterações do ciclo celular e na apoptose de células. Entretanto, é notável a necessidade de outros fatores para o estabelecimento da transformação celular para o câncer (ALLAM et al., 2011). Em um estudo recente, foi sugerir que a infecção do trato urogenital por *U. urealyticum* poderia aumentar o risco de câncer do colo do útero devido a super expressão do oncogene E6 de HPV (KUNDSIN et al., 1971). Apesar de alguns autores demonstrarem a associação entre ureaplasmas e o HPV nas lesões de alto grau (BIERNAT-SUDOLSKA et al., 2011), outros ainda sugerem que infecções por *U. urealyticum* podem induzir a apoptose (HARADA et al., 2008). Sendo assim, mais estudos devem ser conduzidos com a finalidade de entender melhor

os mecanismos de virulência de *Ureaplasma* spp. para tentar compreender sua possível colaboração para a gênese das lesões cervicais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo avaliar a presença de *U. urealyticum*, *U. parvum* e o Vírus do Papiloma Humano (HPV) em mulheres com e sem lesão cervical, bem como avaliar a associação destes microrganismos em infecção de queratinócitos primários humano (PHK) transformados com as proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco (HPV-16).

3.2 Objetivos específicos

- Analisar por PCR a presença de *U. urealyticum* e *U. parvum* e sorotipos de *U. parvum* em mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA.
- Diferenciar e quantificar *U. urealyticum* e *U. parvum* por PCR em Tempo Real (qPCR) no material clínico de mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA.
- Analisar por PCR a presença de Vírus do Papiloma Humano (HPV) em mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA.
- Realizar diagnóstico diferencial de outras bactérias de importância ginecológica (*Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*) em mulheres com lesão e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA.
- Relacionar os perfis demográficos e sexuais obtidos por meio do questionário estruturado com a presença ou ausência de lesão cervical e com os dados obtidos nas PCRs

- Analisar “in vitro” a infecção de *U. urealyticum* e *U. parvum* em queratinócitos primários humanos transformados com as proteínas E6 e E7 do vírus do Papiloma Humano de alto risco (HPV-16), observando variações na curva de crescimento celular;
- Analisar a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL6 e TNF- α produzidas por queratinócitos primários humanos transformados com os genes E6 e E7 do vírus do Papiloma Humano de alto risco (HPV-16) após infecção por *U. urealyticum* e *U. parvum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação da presença de *Ureaplasma spp.* e outros microrganismos de interesse clínico na cérvix de mulheres com e sem lesão cervical

4.1.1 Casuística

O estudo é de caso controle, com casuística total de 140 mulheres sendo 70 casos selecionados de mulheres com lesão no colo do útero e 70 controles (sem lesão no colo do útero). Para a determinação do cálculo amostral, foram utilizados a frequência de HPV na população e o tamanho total da população de Vitória da Conquista (315.000 habitantes). O cálculo amostral foi realizado para um poder estatístico de 85% e um nível de significância de 0,05. Os casos foram coletados no Posto de Saúde da Família CAE II localizado no município de Vitória da Conquista, Bahia. Para seleção dos casos, foi realizada uma triagem entre pacientes com 18 a 70 anos encaminhadas ao ginecologista oncológico com suspeita de lesão cervical. Só foram selecionadas para o presente estudo aquelas que, ao serem encaminhada para realização de colposcopia e/ou biópsia, apresentavam resultados do exame preventivo positivos para lesões no colo do útero, tais como NIC I, II e III, L-SIL ou H-SIL e Carcinoma “in situ”. As outras pacientes foram excluídas do trabalho.

Feita a triagem, as pacientes foram esclarecidas quanto ao objetivo do estudo, e foram instruídas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, realizou-se entrevista entre as pacientes por meio de um questionário estruturado para análise do perfil ginecológico e hábitos de vida. Somente foram selecionadas mulheres que não utilizaram antibióticos nos três meses que antecederem à coleta de material clínico. Foram excluídas do estudo mulheres portadoras do vírus HIV e com diagnóstico de ASCUS ou AGUS. O TCLE e o questionário da entrevista foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (em anexo). O material clínico foi obtido por meio de fricção da mucosa cervical com auxílio de *swab* estéril e transferido para tubo contendo meio de transporte.

As amostras do grupo controle foram obtidas do estudo realizado anteriormente denominado “Detecção de *Mollicutes* no trato urogenital feminino e a sua relação com polimorfismos genéticos e expressão de citocinas em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista – Bahia”. Este estudo foi realizado entre 2011 e 2012 no mesmo município, obedecendo aos mesmos critérios de obtenção de material cervical, processamento das amostras, aplicação de questionário e TCLE. Desse estudo foram coletadas amostras de esfregaço cervical de 302 mulheres que procuraram as Unidades de Saúde da Família (USF) de Vitória da Conquista – BA sem encaminhamento de nenhum outro profissional, ou seja, por busca espontânea para realização do exame preventivo. Assim, para realização do presente estudo, retornou-se às unidades para obtenção dos laudos dos exames citopatológico das pacientes atendidas na época, os quais são registrados nos arquivos da equipe de enfermagem. Aquelas que apresentaram resultados positivos para lesão cervical (NIC I, II e III, L-SIL ou H-SIL e Carcinoma “in situ”) foram excluídas. Das 302 mulheres, 17 foram excluídas. Das 285 restantes com resultado negativo para lesão cervical, realizou-se um sorteio cego para obtenção de 70 amostras que passaram a ser o grupo controle do presente estudo.

4.1.2 Coleta das amostras

Após aplicação do TCLE, o material clínico foi obtido por fricções no colo do útero com auxílio de *swabs*. Estes foram transferidos para tubos com 5 mL de meio de transporte Stewart com adaptações (TULLY, 1983). Esta solução contém 8 g de sacarose, 0,2 g de fosfato de sódio monobásico, 0,4 g de fosfato de sódio bibásico, 10 ml de soro equino e q.s.p 200 ml de água destilada. Não foi adicionado antibiótico ao meio. Os tubos foram armazenados a -20 °C até o dia da coleta. Foi incluído ao material de coleta *swabs* estéreis (Qiagen), luvas, avental, óculos e máscara de proteção e papel toalha.

Após a realização da triagem das pacientes, foram aplicados os questionários estruturados para análise do perfil ginecológico e hábitos de vida da paciente, e a assinatura do TCLE. Só então foi realizada a coleta do material cervical, sob supervisão

do médico oncologista presente. Para obtenção do material, foram realizadas ficções no colo do útero com auxílio de *swab* estéril em toda a região que compreende o colo do útero e da zona de transição entre o colo do útero e a entrada do útero. Os *swabs* com material foram transferidos para os tubos contendo o meio de transporte e em seguida acondicionados em isopor com gelo até o final das coletas diárias. Logo após as coletas, o material foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia do IMS/CAT – UFBA (Vitória da Conquista, Bahia, Brasil) para processamento. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto cada, e os 5 ml de cada tubo foram transferidos para 5 microtubos (Qiagen) estéreis, com 1 ml cada. Os microtubos foram armazenados em caixas devidamente identificadas e acondicionadas à -20 °C. Os mesmos padrões de coleta foram realizados para amostras controle.

4.1.3 Cepas utilizadas como padrão

Para detecção de *U. urealyticum* e *U. parvum*, cepas de *U. urealyticum* e *U. parvum* foram obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O DNA dessas cepas foi extraído e utilizado como controle dos testes moleculares realizados. Para o controle dos experimentos de detecção dos demais microrganismos de interesse ginecológico, foram utilizadas cepas isoladas de amostras clínicas de *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* cedidas pelo Professor Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e Pesquisador Associado do Instituto Fleury.

4.1.4 Extração de DNA das amostras clínicas

Para extração do DNA das amostras clínicas, foi utilizado o kit Pure Link™ Genomic DNA, da Invitrogen®. Todos os reagentes são fornecidos no kit. Essa extração se baseia basicamente em 4 etapas: 1) *Lise celular*, para rompimento das membranas, degradação

de produtos celulares e liberação do DNA da célula. Para isso, 1,0 mL de cada amostra foi descongelado e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 180 µL do Tampão de digestão (*Genomic Digestion Buffer*[®]) e 20 µL de Proteinase K para lisar as células. A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 55 °C, sob constante agitação. Em seguida foi adicionado à solução 20 µL de RNase A, para eliminar resquícios de RNA ainda presentes. Foi realizada a homogeneização dos microtubos, os quais foram mantidos à temperatura ambiente por 2 minutos. Foram adicionados mais 200 µL do Tampão de Lise/Ligação (*Genomic Lysis Binding Buffer*[®]), seguido de homogeneização, preparando a amostra para a próxima etapa; 2) *Ligação do DNA* à coluna de extração: a solução lisada obtida da etapa anterior foi transferida para microtubos contendo uma coluna, denominada de *Spin Column*[®]. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 1 minuto. O líquido foi descartado, e a coluna recolocada nos microtubos, os quais seguiram para a etapa de lavagem; 3) *Lavagem do DNA*: para remoção dos resquícios de produtos celulares ainda presentes, foram adicionados 500 µL do Tampão de Lavagem 1 (*Wash Buffer 1*[®]) à coluna, centrifugada a 14000 rpm por 1 minutos, e descartado o líquido. Em seguida adicionou-se 500 µL do Tampão de Lavagem 2 (*Wash Buffer 2*[®]) devidamente preparado. Os microtubos foram centrifugados e o líquido retido foi descartado; 4) *Eluição do DNA*: com a finalidade de recuperar o DNA retido na coluna, os filtros contendo o DNA foram transferidos para microtubos limpos. Em seguida foi adicionado 100 µL do Tampão de Eluição (*Pure Link™ Genomic Elution Buffer*[®]). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida foram centrifugados a 14000 rpm por 1 minuto. O filtro foi descartado e os tubos contendo DNA foram armazenados à -20 °C.

4.1.5 PCR para detecção de *Mollicutes*

Para detecção de *Mollicutes*, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foi adicionado a um microtubo (0,2 mL) 1X do Tampão (Buffer), 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 2,0 mM de MgCl₂, 50 pmol de cada iniciador (*primer*) descritos no Quadro 1; 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®], São Paulo,

S.P., Brasil), 1,0 µL do DNA obtido de cada amostra e água ultrapura até o volume final de 50 µL. Foram utilizados controles positivos (DNA de cepa padrão de *U. urealyticum*) e negativos (ausência de DNA) em cada reação. A amplificação foi realizada em termociclador programado para um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57,7 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, um ciclo final de 72 °C por 10 min e *hold step* a 4 °C. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transluminador (VAN KUPPEVELD et al., 1992).

Quadro 1 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *Mollicutes* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Produto</i>
GPO3	5' GGGAGCAAACACGATAGATACCCT 3'	~270 pb
MGSO	5' TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC 3'	

4.1.6 PCR para detecção de *U. urealyticum*

Foram utilizados para o preparo da reação 1x do Tampão, 200 µM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 2), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, São Paulo, S.P., Brasil), 3,0 µL de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 50 µL. Foram utilizados controles positivos (DNA de cepa padrão de *U. urealyticum*) e negativos (ausência de DNA) em cada reação. A amplificação foi realizada em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C para anelamento e 45 segundos a 72 °C para extensão, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente

com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (DE FRANCESCO et al., 2009).

Quadro 2 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *U. urealyticum* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

Primers	Sequências	Produto
UMS170	5' GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTCTG 3'	~476 pb
UMA263	5' TTTGTTGTTGCGTTTTCTG 3'	

4.1.7 PCR para detecção de *U. parvum*

Para detecção de *U. parvum* foram utilizados 1x tampão (*buffer*); 200 µM de dNTP; 2,5 mM de MgCl₂; 20 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 3); 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, São Paulo, S.P., Brasil), 3,0 µL de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 50 µL. Foram utilizados controles positivos (DNA de cepa padrão de *U. parvum*) e negativos (ausência de DNA) em cada reação. As amplificações foram realizadas em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C e 45 segundos a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (DE FRANCESCO et al., 2009).

Quadro 3 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *U. parvum* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Produto</i>
UMS57	5' TAAATCTTAGTGTTTCATATTTTTTAC 3'	~326/327 pb
UMA222	5' GTAAGTGCAGCATTAAATTCAATG 3'	

4.1.8 PCR para detecção de sorotipos de *U. parvum*

Para cada sorotipo de *U. parvum* (sorotipo 1, sorotipos 3 e 14, sorotipo 6) foram realizadas diferentes reações, e em cada reação foram adicionados 1X de tampão, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 2,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 4), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 3,0 µL da amostra de DNA extraído e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos, um ciclo final de 72 °C por 10 min e *hold step* a 4 °C. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (DE FRANCESCO et al., 2009).

Quadro 4 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para sorotipos do *U. parvum* e os respectivos pesos moleculares dos produtos amplificados.

Primers	Sequências	Produto
Sorotipo 1		
UMS 83	5' TACTGATAGAAATTATGTAAGATTGC 3'	~398 pb
UMA 269A	5' CCAAATGACCTTTTGTAAGTAGAT 3'	
Sorotipo 3 e 14		
UMS 125	5' GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTCG 3'	~442 pb
UMA 269B	5' CTAAATGACCTTTTTCAAGTGTAC 3'	
Sorotipo 6		
UMS 54	5' CTTAGTGTTTCATATTTTTTACTAG 3'	~369 pb
UMA 269A	5' CCAAATGACCTTTTGTAAGTAGAT 3'	

4.1.9 PCR para detecção de *Neisseria gonorrhoeae*

Para a amplificação de sequências de *N. gonorrhoeae* foram utilizados 1X de tampão, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl₂, 100 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 5), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, São Paulo, S.P., Brasil), 1,0 µL da amostra de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e *hold step* a 4 °C. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (HO et al., 1992).

Quadro 5 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Neisseria gonorrhoeae* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

Primers	Sequências	Produto
HO1	5' GCTACGCATACCCGCGTTGC 3'	~390 pb
HO3	5' CGAAGACG1TCGAGCAGACA 3'	

4.1.10 PCR para detecção de *Gardnerella vaginalis*

Para a amplificação de sequências de *G. vaginalis* foram utilizados 1X de Tampão; 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP); 2,5 mM de MgCl₂; 100 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 6); 2,0 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen®, São Paulo, S.P., Brasil); 1,0 µL da amostra de DNA e e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial 94°C por 10 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos, 72 °C por 30 segundos, um ciclo final de 72 °C por 7 minutos e *hold step* a 4 °C. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (ZARIFFARD et al., 2002).

Quadro 6 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Gardnerella vaginalis* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

Primers	Sequências	Produto
GV1	5' TTACTGGTGTATCACTGTAAGG 3'	~332 pb
GV3	5' CCGTCACAGGCTGAACAGT 3'	

4.1.11 PCR para detecção de *Trichomonas vaginalis*

Para a amplificação de sequências de *T. vaginalis* foram utilizados 1X de tampão; 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 50 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 7); 2,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, São Paulo, S.P., Brasil), 1,0 µL da amostra de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 47 °C por 1 minuto, 67 °C por 1 minuto, um ciclo final de 67 °C por 7 minutos e *hold step* a 4 °C. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (RILEY et al., 1992).

Quadro 7 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Trichomonas vaginalis* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

<i>Primers</i>	Sequências	Produto
TVA5	5' GATCATGTTCTATCTTTTCA 3'	~102 pb
TVA6	5' GATCACACCTTAGTTTACA 3'	

4.1.12 PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis*

Para a amplificação de sequências de *C. trachomatis* foram utilizados 1X de tampão; 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂, 100 pmol de cada *primer* (descritos no quadro 8); 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, São Paulo, S.P., Brasil); 2,0 µL da amostra de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador,

obedecendo a uma desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, um ciclo final de 72 °C por 10 minutos e *hold step* a 4 °C. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), corridos paralelamente com um padrão de peso molecular de 100 pb. Os géis foram fotografados em fotodocumentador com transiluminador (MAHONY et al., 1992).

Quadro 8 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Chlamydia trachomatis* e o respectivo peso molecular do produto amplificado.

Primers	Sequências	Produto
KL1	5' TCCGGAGCGAGTTACGAAGA 3'	~241 pb
KL2	5' ATTCAATGCCCGGGATTGGT 3'	

4.1.13 qPCR para *Ureaplasma urealyticum*

A técnica de PCR em tempo real foi empregada para quantificação de *U. urealyticum* sendo as reações realizadas em duplicata na plataforma Real-Time PCR System 7300 Applied Biosystems e com a utilização de Sondas *TaqMan*, seguindo protocolo base de amplificação do fabricante.

A reação de PCR em tempo real consistiu em 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,75 µL dos *primers* UUureF/UUureR diluídos a 10 pmol (descritos no quadro 9), 0,5 µL de sonda a 5 mM, 1,0 µL de DNA e 9,5 µL de água para um volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação em software *StepOne*, plataforma *Applied Biosystems*, nas seguintes condições de ciclos e temperaturas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 58 °C por 30 segundos (CAO et al., 2007).

Quadro 9 – Sequências dos *primers* e da sonda utilizados para detecção e quantificação de *Ureaplasma urealyticum* nas amostras clínicas.

Primers	Sequências
UUureF	5' ATCGACGTTGCCCAAGGGGA 3'
UUureR	5' TTAGCACCAACATAAGGAGCTAAATC 3'
Sonda	5'-FAM-TTGTCCGCCTTTACGAG-MGB-3'

4.1.14 qPCR para *U. parvum*

A reação de PCR em tempo real consistiu em 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,75 µL dos *primers* UUureF/UUureR diluídos a 10 pmol (descritos no quadro 10), 0,5 µL de sonda a 5 mM, 1,0 µL de DNA e 9,5 µL de água para um volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação em software *StepOne*, plataforma *Applied Biosystems*, nas seguintes condições de ciclos e temperatura: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 58 °C por 30 segundos (CAO et al., 2007).

Quadro 10 – Sequências dos *primers* e da sonda utilizados para detecção e quantificação de *Ureaplasma urealyticum* nas amostras clínicas

Primers	Sequências
UPureF	5' CATTGATGTTGCACAAGGAGAAA 3'
UPureR	5' TTAGCACCAACATAAGGAGCTAAATC 3'
Sonda	5'-FAM-TTGACCACCCTTACGAG-MGB-3'

4.1.15 Análise dos dados obtidos nas qPCR para *U. urealyticum* e *U. parvum*

A quantificação foi realizada por meio de técnica de quantificação absoluta, baseando-se pela curva padrão pré-estabelecida variando de 10^7 a 1 microrganismos/ μL (Figura 7). A cada reação uma nova curva foi adicionada ao sistema, sendo estabelecidas para uma boa análise a obtenção de $r^2 \geq 0,950$; eficiência entre 95 a 105% e *slope* próximo de 3,32. A análise dos dados gerados foi realizada com o auxílio do software StepOne™ software v2.1 (*Applied Biosystems*). Por meio deste software determinou-se o *threshold*, ou limiar de detecção, de cada amostra testada. O *threshold* corresponde a um ponto de referência, uma vez que neste ponto todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o *threshold*, foi estabelecido o número de *Ct* de cada amostra. O número de *Ct* serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* estabelecido.

Figura 7 – Gráficos gerados a partir da reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão utilizada nos testes para a espécie *U. urealyticum*.

Legenda: (a) Amplificação de cada amostra de DNA de *U. urealyticum* da curva padrão, diluída em razão 1:10. (b) Curva padrão gerada a partir dos pontos de *Ct* obtidos com o gráfico de amplificação.

4.1.16 Detecção de HPV nas amostras

Para detecção de HPV, dois microtubos de cada amostra foram encaminhados ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano (INCT/HPV, São Paulo, Brasil). O DNA foi extraído por meio do protocolo Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico. Após descongelamento das amostras, foi obtido o sedimento da suspensão pela centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 200 µl de tampão de digestão (50 mM de Tris-HCl pH 7,5; 1 mM de EDTA; 0,5% de Triton x-100 autoclavado) em um dos microtubos duplicados. O pellet foi ressuspendido e o material foi transferido para o segundo microtubo contendo a mesma amostra. Nesse momento, as amostras correspondentes foram unidas em um único microtubo. Adicionaram-se 200 µl de tampão de proteinase K (200 µg/ml de proteinase k em tampão TE, preparado a 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 1mM de EDTA). As amostras foram incubadas a 55 °C sob agitação por 24 horas. Após 24 horas, foram adicionados 400 µl de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1, pH 8,0), homogeneizado vigorosamente por 1 minuto e centrifugado a 12000rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo devidamente identificado, e foram adicionados 10% do volume obtido de acetado de sódio 3M e 2,5X de etanol 100% gelado. Os microtubos permaneceram a -20 °C *overnight*. Em seguida foi realizada a centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos para descarte do etanol. Foram feitas duas lavagens com etanol a 70%, centrifugando a 15000 por 15 minutos cada. Após secagem do sedimento, foi adicionado 20 µl de água livre de DNase ultrapura autoclavada. Após extração, foi realizada a quantificação (ng/µl) e a verificação da qualidade do material extraído (relações 260/280 e 260/230) por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Amostras com concentrações superiores a 50 ng/µl foram diluídas para 50 ng/µl com a finalidade de padronizar as concentrações para as reações de PCR.

Em seguida foi realizada PCR utilizando *primers* G73/G74 que amplificam 268 pares de base para o gene β -globina, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído (CAMPOS et al., 2008). Os parâmetros da reação foram 1x de buffer; 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,08 µM dos *primers* G73/G74 (descritos no Quadro 11); 0,5

U de Taq DNA polimerase recombinante, todos da Invitrogen® (São Paulo, S.P., Brasil); 6 µL de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e *hold step* a 4 °C. A corrida foi feita em gel de Agarose 1% corado com 0,3% de Gel Red™ (Biotium®). Todas as amostras foram positivas, apresentando boa qualidade para a realização das próximas PCRs.

Quadro 11 – Sequência dos *primers* de β-globina e o respectivo amplicon produzido, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído

<i>Primers</i>	Sequências	Produto
G73	5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'	~268 pb
G74	5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'	

Para detecção de HPV foi realizada PCR utilizando 1x de tampão; 0,2 mM de dNTP; 4 mM de MgCl₂; 1 µM dos *primers* GP5/GP6 (descritos no quadro 12); 0,5 U de Taq DNA polimerase recombinante, todos da Invitrogen® (São Paulo, S.P., Brasil); 3 µL do DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 25 µL. Após adição do DNA, as amostras foram levadas para o termociclador sob o programa de 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, 39 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 40 °C por 2 minutos, 72°C por 1,5 minuto, e um ciclo final a 72 °C por 7 minutos. A corrida foi feita em gel de Agarose 1% corado com 0,3% de Gel Red™ (Biotium®) (GRAVITT et al., 2000; SNIJDERS et al., 1990).

Quadro 12 – Sequência dos *primers* da região L1 de HPV e o respectivo amplicon produzido, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>	<i>Produto</i>
GP5	5' TTTGTTACTGTGGTAGATAC 3'	~154 pb
GP6	5' GAAAAATAAACTGTAAATCAT 3'	

4.2 Estudo das alterações de queratinócitos primários humanos (PHK) após infecção por ureaplasmas

4.2.1 Cultivo de ureaplasmas

Para cultivo de *Ureaplasma* spp., é necessária a utilização de meio UB. O meio UB é um meio próprio para crescimento de *Ureaplasma*. Para o preparo de 100 ml de meio são necessários 2,1 g de PPLO (Merck®) e 63 ml de água destilada. Ajustar para pH 6,0 e autoclavar o meio base a 121 °C por 20 minutos. Acrescentar assepticamente ao meio 20 ml de soro equino, 10 mL de extrato fresco de levedura 25%, 0,5 mL de Penicilina 100000 U/mL, 5,0 mL de CRML 1066 (Invitrogen®), 1,0 mL de ureia 10%, 0,1mL de L-cisteína 2% e 0,4 mL de vermelho de fenol 0,5%. Aguardar o teste de esterilidade a 37 °C por 24 horas. Após esse período, *Ureaplasma urealyticum* sorotipo 7 (ATCC 27819) e *Ureaplasma parvum* sorotipo 3 (ATCC 27815) foram crescidos em 50 mL de meio UB cada. Em seguida foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos em centrifuga refrigerada, e ressuspensos em PBS 1x. Com essa suspensão foi realizada a determinação da Unidade de Mudança Colorimétrica (*Color Change Unit* – CCU) para verificação da carga microbiana. A CCU é determinada pela mudança de cor do meio de cultura causada pelos produtos do metabolismo dos ureaplasmas. Durante seu crescimento, os ureaplasmas produzem amônia, substância que provoca elevação do pH do meio tornando-o alcalino. Isso faz com que a cor previamente alaranjada do meio se torne avermelhada, devido a presença do indicador de mudança do pH (vermelho de

fenol) (FORD; 1972; PURCELL et al., 1966; STEMKE; ROBERTSON, 1982). Para a realização desse teste, 20 µl da suspensão foram transferidos para uma placa de poliestireno com 96 poços contendo 180 µl de meio UB em cada poço, realizando uma diluição seriada decimal (1:10). Logo em seguida, a placa foi fechada e incubada em estufa a 37 °C por 24 horas. A partir dos resultados obtidos foram feitas diluições para a realização das infecções em PHK.

4.2.2 Cultura de células

Para a realização dos ensaios foram utilizadas linhagens de queratinócitos primários humanos (PHK) transduzidas com vetor pLXSN vazio e contendo os genes E6 e E7 de HPV 16, cultivadas em meio KSFM suplementado com EGF recombinante (fator de crescimento epitelial) e extrato de pituitária bovina (Invitrogen). As células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Enrique Boccardo (laboratório de Oncovirologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

As células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após atingirem confluência adequada, as células foram contadas e transferidas para placas de poliestireno de 24 poços com a finalidade de obter 1000 células/poço. Após aderência das células aos poços (aproximadamente 12 horas), alguns poços foram selecionados para realização da contagem das células, utilizando Câmara de Neubauer. Foi obtida uma média de 1333 células/poço para células PHK vazia e 3500 para PHK com vetor contendo os genes E6 e E7 de HPV-16. Dessa forma, foram realizadas infecções em triplicata com 100µl de suspensão ureaplasmas à 10³-10⁴. Dessa forma, a multiplicidade da infecção (MOI) de ureaplasmas em células foi igual a 1,0 (MOI=1,0), ou seja, 1 microrganismo para cada célula. As infecções foram feitas obedecendo aos seguintes critérios:

- 1) Células PHK com vetor pLXSN vazio (controle 1);
- 2) Células PHK com vetor pLXSN vazio e infectadas com *U. parvum* sorotipo 3;

- 3) Células PHK com vetor pLXSN vazio e infectadas com *U. urealyticum* sorotipo 7;
- 4) Células PHK com vetor pLXSN contendo os genes E6 e E7 (controle 2);
- 5) Células PHK com vetor pLXSN contendo os genes E6 e E7 infectadas *U. parvum* sorotipo 3;
- 6) Células PHK com vetor pLXSN contendo os genes E6 e E7 infectada com *U. urealyticum* sorotipo 7.

4.2.3 Curva de crescimento

A curva de crescimento foi avaliada nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após infecção por *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*. Em cada tempo, o sobrenadante foi recolhido para dosagem de citocinas. Para cada etapa as células foram lavadas com PBS 1X e adicionava-se 100 µl de tripsina para o desprendimento das células. Após a lavagem, foram adicionados 100 µl de meio D10 (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino) para interromper a ação da tripsina. As células foram contadas em Câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico.

4.2.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante das células

A dosagem das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram realizadas utilizando-se kit de ELISA de captura (eBioscience, San Diego, C. A., Estados Unidos) em placas de 96 poços de poliestireno de alta absorção de acordo com protocolo indicado pelo fabricante. Após padronização da curva padrão, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante das células foi utilizada para dosar as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6. A leitura foi realizada com instrumento leitor de ELISA *Vivid Vision* com comprimento de onda de 450 nm. Os dados obtidos em absorbância foram transformados em picomols por meio de fórmula matemática.

4.3 Análise Estatística

As análises estatísticas da presença dos microrganismos detectados nas amostras clínicas e dos dados obtidos dos questionários foram avaliados por meio do software SPSS 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, Estados Unidos). O teste qui-quadrado (X^2) ($p \leq 0,05$) foi utilizado para verificar a existência de associação entre os microrganismos encontrados nas lesões, os dados demográficos e a presença de lesão cervical. Além disso, foi calculada a razão de chances (*odds ratio*) (I.C. 95%) com o objetivo de quantificar, ou seja, verificar o poder da associação entre as variáveis supracitadas. Para verificar se as distribuições de cargas dos microrganismos são similares entre os grupos de estudo foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, visto que as pré-suposições para utilização de um teste paramétrico não foram satisfeitas. Para maximizar a função de verossimilhança do risco e descartar variáveis de confusão, empregou-se análise multivariada por regressão logística.

As análises de curva de crescimento celular e dosagem de citocinas foram feitas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 (*GraphPad Software*, San Diego California, USA). Foram realizados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com a finalidade de comparar 3 ou mais grupos, com pós-teste de Dunn, para detectar diferenças 2 a 2 entre as células infectadas e os controles.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da presença de *Ureaplasma spp.* e outros microrganismos de interesse clínico na cérvix de mulheres com e sem lesão cervical

Por meio das coletas, foram obtidas 140 amostras, sendo 70 de mulheres com lesão cervical, as quais passaram a ser chamado de grupo caso e 70 de mulheres com diagnóstico negativo para lesão cervical, as quais passaram a pertencer ao grupo controle. Entretanto, após as coletas foi verificado que uma amostra dentre os casos apresentava diagnóstico de ASCUS, ou seja, atipia de células escamosas de significado indeterminado. Essa alteração não é enquadrada como lesão precursora do câncer cervical. Devido a esse fato, tal amostra foi descartada das análises subsequentes. Assim, o grupo caso passou a ter 69 observações. A tabela 1 mostra a distribuição dos resultados obtido do exame citopatológico das pacientes selecionadas para compor o estudo. Entre as pacientes do grupo caso, foi detectado um maior número de pacientes com lesão de alto grau (19,3%).

Tabela 1 – Resultados obtidos dos exames citopatológico das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.

Resultado do exame citopatológico	N	%
Baixo Grau (NIC I)	26	18,6
Intermediário (NIC II)	16	11,4
Alto Grau (NIC III/Carcinoma “in situ”)	27	19,3
<u>ASCUS</u>	1	0,7
Negativo para lesões	70	50,0
TOTAL	140	100

Os resultados obtidos por meio das reações da cadeia da polimerase convencional e quantitativa (PCR e qPCR) para os diferentes microrganismos foram relacionados com

pacientes com e sem lesão cervical (Tabela 2). O grupo de pacientes com lesões de alto grau apresentou maior positividade para HPV, *U. parvum* (PCR e qPCR), *T. vaginalis* e *Gardnerella vaginalis*. A menor detecção observada de *U. parvum* e *U. urealyticum* pela PCR convencional é devido a menor sensibilidade desta técnica quando comparada à qPCR. Esta técnica é mais específica e mais sensível, o que permitiu maior detecção dessas espécies. Entre aquelas com lesões moderadas, *U. urealyticum*, em ambas as técnicas (PCR e qPCR), e *U. parvum* sorotipo 1 foram mais detectados. No grupo com lesões de baixo grau, *Mollicutes*, *U. parvum* – sorotipos 3 e 14 e *C. trachomatis* foram mais detectados. *U. parvum* sorotipo 6 foi detectado igualmente entre aquelas com lesões de graus moderado (5,3%) e baixo (5,3%), sendo mais detectado entre aquelas sem lesão cervical (89,5%). *N. gonorrhoeae* não foi detectado entre pacientes com lesão, apenas entre aquelas sem lesão cervical (n=15).

Tabela 2 – Resultados obtidos das PCR relacionando com as diferentes lesões presentes no colo do útero das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.

(Continua)

Variáveis	Exame citopatológico				Total
	Baixo Grau (NIC I)	Intermediário (NIC II)	Alto Grau (NIC III ou Carcinoma “in situ”)	Sem Lesão	
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
PCR Convencional					
HPV					
Positivo	12 (19,0)	12 (19,0)	22 (34,9)	17 (27,0)	63
Negativo	14 (18,4)	4 (5,3)	5 (6,6)	53 (69,7)	76
Mollicutes					
Positivo	26 (23,2)	14 (12,5)	24 (21,4)	48 (42,9)	112
Negativo	0 (0,0)	2 (7,4)	3 (11,1)	22 (81,5)	27
U. urealyticum					
Positivo	1 (12,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	8
Negativo	25 (19,1)	13 (9,9)	26 (19,8)	67 (51,1)	131
U. parvum					
Positivo	9 (12,9)	12 (17,1)	14 (20,0)	35 (50,0)	70
Negativo	17 (24,6)	4 (5,8)	13 (18,8)	35 (50,7)	69

Tabela 2 – Resultados obtidos das PCR relacionando com as diferentes lesões presentes no colo do útero das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.

(Conclusão)

Variáveis	Exame citopatológico				Total
	Baixo Grau (NIC I)	Intermediário (NIC II)	Alto Grau (NIC III ou Carcinoma “in situ”)	Sem Lesão	
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
<i>U. parvum</i> – sorotipo 1					
Positivo	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	9 (90,0)	10
Negativo	26 (20,2)	15 (11,6)	27 (20,9)	61 (47,3)	129
<i>U. parvum</i> – sorotipo 3 e 14					
Positivo	6 (27,3)	2 (9,1)	4 (18,2)	10 (45,5)	22
Negativo	20 (17,1)	14 (12,0)	23 (19,7)	60 (51,3)	117
<i>U. parvum</i> – sorotipo 6					
Positivo	1 (5,3)	1 (5,3)	0 (0,0)	17 (89,5)	19
Negativo	25 (20,8)	15 (12,5)	27 (22,5)	53 (44,2)	120
<i>Chlamydia trachomatis</i>					
Positivo	2 (50,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	4
Negativo	24 (17,8)	16 (11,9)	26 (19,3)	69 (51,1)	135
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>					
Positivo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (100,0)	15
Negativo	26	16	27	55	124
<i>Trichomonas vaginalis</i>					
Positivo	15 (31,9)	10 (21,3)	18 (38,3)	4 (8,5)	47
Negativo	11 (12,0)	6 (6,5)	9 (9,8)	66 (71,7)	92
<i>Gardnerella vaginalis</i>					
Positivo	23 (22,8)	15 (14,9)	26 (25,7)	37 (36,6)	101
Negativo	3 (7,9)	1 (2,6)	1 (2,6)	33 (86,8)	38
PCR Real Time (qPCR)					
<i>U. urealyticum</i>					
Positivo	4 (21,1)	5 (26,3)	1 (5,3)	9 (47,4)	19
Negativo	22 (18,3)	11 (9,2)	26 (21,7)	61 (50,8)	120
<i>U. parvum</i>					
Positivo	19 (19,8)	15 (15,6)	21 (21,9)	41 (42,7)	96
Negativo	7 (16,3)	1 (2,3)	6 (14,0)	29 (67,4)	43

As lesões de graus moderado (NIC II) e alto (NIC III e Carcinoma “in situ”) foram agrupadas para a realização do teste de correlação (X^2) e para realização da análise de *Odds Ratio*, com a finalidade de observar a chance entre a presença dos diferentes microrganismos para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (Tabela 3). Apenas a

presença de HPV (O.R.= 4,407; I.C.= 1,519 -12,786) e de *U. parvum* (por meio da PCR convencional) (O.R.= 2,889; I.C.= 1,049-7,957) apresentaram relações estatisticamente significantes.

Tabela 3 – Resultados obtidos das PCR com relação às lesões de baixo grau e de alto grau (agrupada em graus alto e intermediário) presentes no colo do útero das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.

(Continua)

Variáveis	Exame citopatológico		Odds Ratio (bruta)	I.C. 95%	P*
	Intermediário (NIC II) e Alto Grau (NIC III e Carcinoma “in situ”)	Baixo Grau (NIC I)			
	n(%)	n(%)			
HPV					
Positivo	34 (73,9)	12 (26,1)	4,407	1,519 -12,786	0,0049*
Negativo	9 (39,1)	14 (60,9)	1		
Mollicutes					
Positivo	38 (59,4)	26 (40,6)	N.D.	--	--
Negativo	5 (100,0)	0 (0,0)			
<i>U. urealyticum</i>					
Positivo	4 (80,0)	1 (20,0)	2,564	0,271-24,281	0,713
Negativo	39 (60,9)	25 (39,1)	1		
<i>U. parvum</i>					
Positivo	26 (74,3)	9 (25,7)	2,889	1,049-7,957	0,037*
Negativo	17 (50,0)	17 (50,0)	1		
<i>U. parvum</i> – sorotipo 1					
Positivo	1 (100,0)	0 (0,0)	N.D.	--	--
Negativo	42 (67,8)	26 (38,2)			
<i>U. parvum</i> – sorotipo 3 e 14					
Positivo	6 (50,0)	6 (50,0)	0,541	0,154-1,897	0,333
Negativo	37 (64,9)	20 (35,1)	1		
<i>U. parvum</i> – sorotipo 6					
Positivo	1 (50,0)	1 (50,0)	0,593	9,943	1,000
Negativo	42 (62,7)	25 (37,3)	1		
<i>Chlamydia trachomatis</i>					
Positivo	1 (33,3)	2 (66,7)	0,286	0,025-3,319	0,653
Negativo	42 (63,6)	24 (36,4)	1		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>					
Positivo	0	0	N.D.	--	--
Negativo	43 (62,3)	26 (37,7)			
<i>Trichomonas vaginalis</i>					
Positivo	28 (65,1)	15 (34,9)	1,369	0,504-3,718	0,537
Negativo	15 (57,7)	11 (42,3)	1		
<i>Gardnerella vaginalis</i>					
Positivo	41 (64,1)	23 (35,9)	2,674	17,187	0,555
Negativo	2 (40,0)	3 (60,0)	1		

Tabela 3 – Resultados obtidos das PCR com relação às lesões de baixo grau e de alto grau (agrupada em graus alto e intermediário) presentes no colo do útero das pacientes atendidas no município de Vitória da Conquista, Bahia, entre 2011-2013.

(Conclusão)

Variáveis	Exame citopatológico		Odds Ratio (bruta)	I.C. 95%	P*
	Intermediário (NIC II) e Alto Grau (NIC III e Carcinoma “in situ”)	Baixo Grau (NIC I)			
	n(%)	n(%)			
PCR <i>Real Time</i> (qPCR)					
<i>U. urealyticum</i>					
Positivo	6 (60,0)	4 (40,0)	0,892	0,226-3,513	1,000
Negativo	37 (62,7)	22 (37,3)	1		
<i>U. parvum</i>					
Positivo	36 (65,5)	19 (34,5)	1,895	0,579-6,203	0,287
Negativo	7 (50,0)	7 (50,0)	1		

Nota: * significância estatística quando p-valor $\leq 0,05$

N.D.= não definida

Em uma nova análise, as lesões de graus baixo (NIC I), moderado (NIC II) e alto (NIC III e Carcinoma “in situ”) foram agrupadas. Em seguida, foram realizados os testes de correlação (χ^2) e de *Odds Ratio* para verificar se a positividade nas PCRs para os diferentes microrganismos aumenta a risco para o desenvolvimento de lesão cervical (Tabela 4). Relações de risco foram detectadas para HPV (O.R.= 6,235; I.C.= 2,972-13,081), *Mollicutes* (O.R 5,867; I.C.= 2,072-16,609), *N. gonorrhoeae* (O.R.= 2,255; I.C.= 1,851-2,746), *T. vaginalis* (O.R.= 27,3; I.C.= 8,9-83,68), *G. vaginallis* (O.R.= 11,4; I.C.= 4,1-31,786) e *U. parvum* (qPCR) (O.R.= 2,779; I.C.= 1,306-5,914). A presença de *U. parvum* sorotipo 1 (O.R.= 0,100; I.C.= 0,012-0,810) e sorotipo 6 (O.R.= 0,093; I.C.= 0,021-0,421) foram verificados como fator de proteção para o desenvolvimento de lesão cervical.

Tabela 4 – Relação dos grupos caso e controle com a presença de HPV (O.R.= 6,235; I.C.= 2,972 - 13,081), *Mollicutes*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e dos sorotipos 1, 3 e 14 e 6 de *Ureaplasma parvum*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Gardnerella vaginalis* detectados por PCR convencional e para *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em PCR em tempo real (qPCR). Amostras obtidas por meio swab cervical de mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.

(Continua)

Variáveis	Presença de	Ausência de	Odds ratio (bruta)	I.C. 95%	P*
	Lesão Cervical	Lesão Cervical			
	N=69 (%)	N=70 (%)			
PCR convencional					
HPV					
Positivo	46 (73,0)	17 (27,0)	6,235	2,972 - 13,081	<0,0001*
Negativo	23 (30,3)	53 (69,7)	1		
<i>Mollicutes</i>					
Positivo	64 (57,1)	48 (42,9)	5,867	2,072-16,609	0,000314*
Megativo	5 (18,5)	22 (81,5)	1		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>					
Positivo	5 (62,5)	3 (37,5)	1,745	0,400-7,602	0,700
Negativo	64 (48,9)	67 (51,1)	1		
<i>Ureaplasma parvum</i>					
Positivo	35 (50,0)	35 (50,0)	1,029	0,529-2,002	0,932
Negativo	34 (49,3)	35 (50,7)	1		
<i>U. parvum</i> sorotipo 1					
Positivo	1 (10,0)	9 (90,0)	0,100	0,012-0,810	0,023*
Negativo	68 (52,7)	61 (47,3)	1		
<i>U. parvum</i> sorotipos 3 e 14					
Positivo	12 (54,5)	10 (45,5)	1,263	0,506-3,151	0,616
Negativo	57 (48,7)	60 (51,3)	1		
<i>U. parvum</i> sorotipo 6					
Positivo	2 (10,5)	17 (89,5)	0,093	0,021-0,421	0,000619*
Negativo	67 (55,8)	53 (44,2)	1		

Tabela 4 – Relação dos grupos caso e controle com a presença de HPV, *Mollicutes*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e dos sorotipos 1, 3 e 14 e 6 de *Ureaplasma parvum*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Gardnerella vaginalis* detectados por PCR convencional e para *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em PCR em tempo real (qPCR). Amostras obtidas por meio swab cervical de mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.

(Conclusão)

Variáveis	Presença de Lesão Cervical	Ausência de Lesão Cervical	Odds ratio (bruta)	I.C. 95%	P*
	N=69 (%)	N=70 (%)			
<i>Chlamydia trachomatis</i>					
Positivo	3 (75,0)	1 (25,0)	3,136	0,318-30,915	0,602
Negativo	66 (48,9)	69 (51,1)	1		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>					
Positivo	0 (0,0)	15 (100,0)	N.D.	--	--
Negativo	69 (55,6)	55(44,4)			
<i>Trichomonas vaginalis</i>					
Positivo	43 (91,5)	4 (8,5)	27,3	8,9-83,68	0,0001*
Negativo	26 (28,3)	66 (71,7)	1		
<i>Gardnerella vaginallis</i>					
Positivo	64 (63,4)	37 (36,8)	11,4	4,1-31,786	0,0001*
Negativo	5 (13,2)	33 (86,8)	1		
qPCR					
<i>U. urealyticum</i>					
Positivo	10 (52,6)	9 (47,4)	1,149	0,436-3,028	0,973
Negativo	59 (49,2)	61 (50,8)	1		
<i>U. parvum</i>					
Positivo	55 (57,3)	41 (42,7)	2,779	1,306-5,914	0,0070*
Negativo	14 (32,6)	29 (67,4)	1		

Nota: * significância estatística quando p-valor $\leq 0,05$

Em relação aos perfis demográfico e sexual, tanto o fato da paciente possuir idade maior de 30 anos (OR= 2,807; IC95%= 1,275-6,179) quanto residir em zona rural (OR=2,625; IC 95%=1,130-6,100) mostraram-se como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais. Entretanto, manter vida sexual ativa (OR=0,202; IC 95%= 0,071-0,580) e não possuir uma relação estável (OR=0,069; IC95%= 0,030-0,157) apresentaram-se como possíveis fatores protetores (Tabela 5).

Tabela 5 – Perfis demográfico e sexual relacionados com a presença ou ausência de lesão cervical em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.

(Continua)

Variáveis	Presença de Lesão Cervical	Ausência de Lesão Cervical	Odds ratio (bruta)	I.C. 95%	P*
	N=70 (%)	N=70 (%)			
Perfil Demográfico					
Idade					
> 30 anos	57 (56,4)	44 (43,6)	2,807	1,275-6,179	0,009*
≤ 30 anos	12 (31,6)	26 (68,4)	1		
Região					
Rural	21 (67,7)	10 (32,3)	2,625	1,130-6,100	0,022*
Urbana	48 (44,4)	60 (55,6)	1		
Raça/Cor					
Preta/Parda/Indígena	54 (51,9)	50 (48,1)	1,440	0,665-3,117	0,353
Branca/Amarela	15 (42,9)	20 (57,1)	1		
Escolaridade					
< Ensino Médio	51 (49,5)	52 (50,5)	0,981	0,459-2,095	0,960
≥ Ensino Médio	18 (50,0)	18 (50,0)	1		
Saúde Sexual					
Menarca					
< 15 anos	58 (51,8)	54 (48,2)	1,562	0,666-3,664	0,303
≥ 15 anos	11 (40,7)	16 (59,3)	1		
Primeira relação sexual					
≤ 18 anos	48 (50,5)	47 (49,5)	1,119	0,547-2,287	0,759
> 18 anos	21 (47,7)	23 (52,3)	1		
Relação estável					
Não	16 (21,9)	57 (78,1)	0,069	0,030-0,157	<0,0001*
Sim	53 (80,3)	13 (19,7)	1		

Tabela 5 – Perfis demográfico e sexual relacionados com a presença ou ausência de lesão cervical em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.

(Conclusão)

Variáveis	Presença de Lesão Cervical	Ausência de Lesão Cervical	Odds ratio (bruta)	I.C. 95%	P*
	N=70 (%)	N=70 (%)			
Vida Sexual					
Ativa	50 (43,5)	65 (56,5)	0,202	0,071-0,580	0,001*
Inativa	19 (79,2)	5 (20,8)			
Parceiros na Vida					
>1	51 (56,0)	40 (44,0)	2,125	1,038-4,349	0,038*
=1	18 (37,5)	30 (62,5)	1		
Uso de Condôm³					
Raro/Ocasional	57 (50,0)	57 (50,0)	1,083	0,456-2,576	0,856
Sempre	12 (48,0)	13 (52,0)	1		
Contracepção Hormonal					
Sim	20 (43,5)	26 (56,5)	0,691	0,339-1,406	0,307
Não	49 (52,7)	44 (47,3)	1		
Gestações					
Sim	65 (50,4)	65 (49,6)	1,523	0,410-5,654	0,527
Não	4 (40,0)	6 (60,0)	1		
Nº gestações					
≤2	33 (45,2)	40 (54,8)	0,688	0,352-1,342	0,271
>2	36 (54,5)	30 (45,5)	1		
Aborto espontâneo					
Não	50 (51,5)	47 (48,5)	1,288	0,623-2,663	0,495
Sim	19 (45,2)	23 (54,8)	1		

Nota: * significância estatística quando p-valor ≤ 0,05

Observamos na tabela 6 que ao ajustarmos as variáveis idade, região em que se vive, vida sexual ativa e parceiros na vida, a chance de desenvolver lesão cervical aumentou em todas as variáveis que anteriormente apresentaram significância pela análise bivariada, com exceção da presença de *U. parvum* detectado por qPCR, a qual diminuiu após o ajuste. A presença de *U. urealyticum* e *U. parvum* por PCR continuaram não apresentando associação com a presença de lesões, mesmo após os ajustes.

Tabela 6 – Associação das variáveis obtidas por meio da PCR e qPCR e a presença de lesão cervical, com exclusão das variáveis confundidoras. Amostras obtidas por meio swab cervical de mulheres com e sem lesão cervical atendidas no município de Vitória da Conquista – BA, entre 2011 e 2013.

(Continua)

Variáveis	Presença de Lesão Cervical	Ausência de Lesão Cervical	OR (bruto)	OR (ajustado)
	N=69 (%)	N=70 (%)	IC 95%	IC 95%
PCR convencional				
HPV				
Positivo	46 (73,0)	17 (27,0)	6,235 (2,972 - 13,081)	7,51 (3,20-17,63)
Negativo	23 (30,3)	53 (69,7)	1	1
Mollicutes				
Positivo	64 (57,1)	48 (42,9)	5,867 (2,072-16,609)	11,0 (2,83-42,40)
Negativo	5 (18,5)	22 (81,5)	1	1
Ureaplasma urealyticum				
Positivo	5 (62,5)	3 (37,5)	1,745 (0,400-7,602)	2,42 (0,48-12,30)
Negativo	64 (48,9)	67 (51,1)	1	1
Ureaplasma parvum				
Positivo	35 (50,0)	35 (50,0)	1,029 (0,529-2,002)	1,14 (0,55-2,36)
Negativo	34 (49,3)	35 (50,7)	1	1
Trichomonas vaginalis				
Positivo	43 (91,5)	4 (8,5)	27,3 (8,9-83,68)	33,84 (9,96-114,91)
Negativo	26 (28,3)	66 (71,7)	1	1
Gardnerella vaginalis				
Positivo	64 (63,4)	37 (36,8)	11,4 (4,1-31,786)	14,04 (4,44-44,38)
Negativo	5 (13,2)	33 (86,8)	1	1
qPCR				
U. parvum				
Positivo	55 (57,3)	41 (42,7)	2,779 (1,306-5,914)	2,53 (1,12-5,69)
Negativo	14 (32,6)	29 (67,4)	1	1

*Ajustado para: idade, região, vida sexual, parceiros na vida

Ao analisar a quantidade (carga) de *U. urealyticum* e *U. parvum* por µl de material coletado em mulheres com e sem lesão cervical, foi verificado que pacientes com lesão cervical apresentaram maior carga de *U. parvum* ($\sim 6,5 \times 10^5$ UFC/µl) do que aquelas sem lesão cervical ($\sim 7,5 \times 10^4$ UFC/µl) (p-valor $\leq 0,001$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para a carga de *U. urealyticum* entre as mulheres com e sem lesão cervical (Figura 8).

Figura 8 – Quantificação, por qPCR, de *U. urealyticum* e *U. parvum* (UFC/μl) a partir das amostras de swab vaginal, obtidos de mulheres com e sem lesão cervical.

Legenda: (a) Concentração de *U. urealyticum* (UFC/μL) entre as mulheres com lesão (~30 UFC/μl) e sem lesão (~28 UFC/μl). (b) Concentração de *U. parvum* (UFC/μL) entre as mulheres com lesão (~ $6,5 \times 10^5$ UFC/μl) e sem lesão (~ $7,5 \times 10^4$ UFC/μl) (**p-valor=0,0006). Mediana e amplitude interquartílica indicadas por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney, assumindo p-valor $\leq 0,05$.

5.2 Estudo das alterações de queratinócitos primários humanos (PHK) após infecção por ureaplasmas

5.2.1 Curva de crescimento

Foram realizadas infecções por *U. urealyticum* e *U. parvum* em queratinócitos primários humanos (PHK). As infecções foram feitas em um grupo de células PHK transduzidas anteriormente com vetor pLXSN vazio (ou seja, sem HPV) e em outro grupo de células PHK transduzidas previamente com vetor pLXSN contendo os genes E6 e E7 de HPV 16. Foram mantidos controles para ambos os grupos (células não infectadas com ureaplasmas), com a finalidade de realizar comparações com os grupos infectados. Quando passadas 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após as infecções, as células foram contadas em câmara de Neubauer.

Entre as células transduzidas com vetor pLXSN vazio, foi observado que nas primeiras 48 horas o número de células nos grupos infectados com *U. parvum* e *U. urealyticum* foi equivalente ao grupo controle. Entretanto, após 72 horas de infecção, houve uma diminuição no número de células entre os grupos infectados (tanto com *U. urealyticum* quanto com *U. parvum*) quando comparado com o grupo controle, mas essa diferença só foi significativa no grupo de células infectadas por *U. urealyticum* nos tempos de 96 ($p=0,0273$) e 120 horas ($p=0,0241$) quando comparada com o grupo controle. Não foram detectadas diferenças significantes entre o número de células infectadas por *U. parvum* e o grupo controle em nenhum dos tempos testados.

Entre as células transduzidas com vetor pLXSN contendo os genes E6 e E7 de HPV 16, logo após 24 horas já foi observada uma tendência para um menor número de células entre os grupos infectados tanto com *U. urealyticum* quanto com *U. parvum*. Contudo, a diminuição do número de células só foi significativa após 72 horas de infecção por *U. urealyticum* ($p=0,0379$), e após 96 horas de infecção por *U. parvum* ($p=0,0273$), quando comparados com o grupo controle (Figura 9).

Figura 9 – Curva de crescimento de queratinócitos primários humanos (PHK).

Legenda: As PHKs foram divididas em dois grupos: células transduzidas com vetores vazios (pLXSN vazio) e células transduzidas com vetores que expressam proteínas E6 e E7 de HPV 16 (pLXSN E6E7). Ambos os grupos foram infectados com *U. urealyticum* e *U. parvum*. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico no momento da infecção e em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a infecção. Para observar diferença entre os grupos infectados e os grupos controle foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) com pós-teste de Dunn ($p \leq 0,05$). Observou-se uma diminuição significativa no número de células entre os seguintes grupos: **1)** pLXSN vazio infectado com *U. urealyticum* após 96 ($p=0,0273$); **2)** pLXSN vazio infectados com *U. urealyticum* após 120 horas ($p=0,0241$) **3)** pLXSN E6E7 infectado com *U. urealyticum* após 72 horas ($p=0,0379$) e **4)** pLXSN E6E7 infectado com *U. parvum* após 96 horas de infecção ($p=0,0273$).

5.2.2 Dosagem de citocinas

Com a finalidade de observar a resposta inflamatória de queratinócitos primários humanos (PHK) frente a infecção por diferentes microrganismos (*U. urealyticum*, *U. parvum* e HPV), foi realizada a dosagem de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pela técnica de ELISA, comparando com os grupos controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a dosagem de IL-1 β entre os grupos estudados nos diferentes tempos (Figura 10).

Figura 10 – Liberação de IL-1 β por queratinócitos primários humanos (PHK).

Legenda: As PHKs foram divididas em dois grupos: células transduzidas com vetores vazios (pLXSN vazio) e células transduzidas com vetores que expressam proteínas E6 e E7 de HPV 16 (pLXSN E6E7). Ambos os grupos foram infectados com *U. urealyticum* e *U. parvum*. Foram realizadas dosagens das citocinas (pg/ml) após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas da infecção. Para observar a diferença de liberação de citocinas entre os diferentes grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) com pós-teste de Dunn ($p \leq 0,05$). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes na liberação da citocina entre os grupos estudados.

Em relação à citocina IL-6, houve maior liberação principalmente pelas células que expressavam as proteínas E6 e E7 de HPV (pLXSN E6E7) e que foram infectadas por um dos ureaplasmas. Nos tempos de 24 e 48 horas, as células infectadas com *U. urealyticum* (pLXSN E6E7- *U. urealyticum*) liberaram mais citocina do que o grupo controle (pLXSN E6E7-controle). O mesmo foi observado no tempo de 120 horas entre aquelas infectadas com *U. parvum* (pLXSN E6E7 - *U. parvum*). Entre as células que não expressavam proteínas de HPV (pLXSN vazio), apenas aquelas infectadas com *U. parvum* (pLXSN vazio – *U. parvum*) no tempo de 72 horas liberaram mais citocina quando comparado com o grupo controle (pLXSN vazio-controle) (Figura 11).

Figura 11 – Liberação de IL-6 por queratinócitos primários humanos (PHK).

Legenda: As PHKs foram divididas em dois grupos: células transduzidas com vetores vazios (pLXSN vazio) e células transduzidas com vetores que expressam proteínas E6 e E7 de HPV 16 (pLXSN E6E7). Ambos os grupos foram infectados com *U. urealyticum* e *U. parvum*. Foram realizadas dosagens das citocinas (pg/ml) após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas da infecção. Para observar a diferença de liberação da citocina entre os diferentes grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p \leq 0,05$). A presença de colchetes e asterisco indica a presença de diferença estatisticamente significativa na liberação de citocinas entre os grupos infectados com *U. urealyticum* ou *U. parvum* e os respectivos grupos controles.

Em relação à citocina TNF- α , foi observado um pico de liberação em 48 horas entre as células com vetor pLXSN vazio, tanto para as células infectadas quanto para o grupo controle; contudo, não houve diferença estatisticamente significativa na liberação da citocina entre os grupos infectados e o grupo controle. No mesmo período, células transduzidas com o vetor pLXSN contendo os genes E6E7 de HPV 16 e infectadas com *U. urealyticum* apresentaram maior liberação da citocina do que

o grupo controle. Houve maior liberação da citocina também para o grupo pLXSN vazio infectado com *U. urealyticum* após 120 horas (Figura 12).

Figura 12 – Liberação de TNF- α por queratinócitos primários humanos (PHK).

Legenda: As PHKs foram divididas em dois grupos: células transduzidas com vetores vazios (pLXSN vazio) e células transduzidas com vetores que expressam proteínas E6 e E7 de HPV 16 (pLXSN E6E7). Ambos os grupos foram infectados com *U. urealyticum* e *U. parvum*. Foram realizadas dosagens das citocinas (pg/ml) após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas da infecção. Para observar a diferença de liberação da citocina entre os diferentes grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p \leq 0,05$). A presença de colchetes e asterisco indica a presença de diferença estatisticamente significativa na liberação da citocina entre os grupos infectados com *U. urealyticum* ou *U. parvum* e os respectivos grupos controles.

6 DISCUSSÃO

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres, e é um dos que mais causam mortes entre o público feminino no mundo. Apesar dessas características, o câncer cervical é considerado de desfecho raro devido às particularidades da infecção por seu agente etiológico, o HPV, causa necessária para seu desenvolvimento (IARC, 2012a; INCA, 2014). No início da infecção ocorre a replicação viral, desencadeando infecções clínicas ou subclínicas. As infecções subclínicas ocorrem com maior frequência e cursam sem sintomas, uma vez que o vírus é erradicado ou suprimido a níveis não detectáveis pelo sistema imune do hospedeiro. As infecções clínicas podem resultar em lesões de baixo (LSIL - NIC I) ou auto grau (HSIL - NIC II, NIC III, Carcinoma “in situ”), sendo que o desenvolvimento destas ocorrem por consequência da persistência da infecção por HPVs de alto risco (como HPV 16 e HPV 18) (IARC, 2007).

No presente estudo, das 139 mulheres estudadas, 63 (45,3%) foram positivas para HPV. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados encontrados no Brasil. Em revisão realizada por Ayres e Silva et al. (2010) foram comparadas as prevalências de HPV de estudos realizados em diferentes regiões do país (3 em São Paulo – SP; 1 em São Paulo – SP e no Recife – PE; 1 em João Pessoa – PB; 2 em Porto Alegre – RS; 1 em aldeias indígenas, Novo Repartimento e Itupiranga – PA; 1 em Crato, Sobral, Pedra Branca, Redenção e Ibiapina – CE; 1 em Duque de Caxias e Nova Iguaçu – RJ; 1 compreendendo a população do Estado do Rio de Janeiro; 1 realizado em São Paulo e Campinas – SP; e 1 em Blumenau – SC), compreendendo os períodos de 1989 à 2008. A prevalência geral de infecção do colo do útero pelo HPV variou de 13,7% a 54,3%.

Quando se analisa a presença de HPV em relação às lesões precursoras, o HPV é detectado em 60% (DEODHAR et al., 2012). Em estudo de metanálise realizado por Smith et al. (2007) observaram que a detecção de HPV em lesões de alto grau está em torno dos 85%. Entre os casos de câncer cervical invasivo, a detecção de HPV aumenta para a faixa de 90 a 100% (DOORBAR, 2006). No presente estudo, não houve seleção de casos apresentando câncer invasivo. Contudo, 73% dos casos de lesões precursoras foram positivos para HPV. Foram positivas para HPV 46,2% das lesões de baixo grau (LSIL-NIC I) e 79,1% (75,0% com NIC II e 81,5% com NIC III)

das lesões de alto grau (HSIL). Dados semelhantes foram encontrados por Mendonça et al. (2010) em estudo de caso-controle realizado em Recife, Pernambuco. Das 610 mulheres inicialmente elegíveis, 331 (54,3%) apresentaram PCR positiva para HPV, sendo que 87,5% entre aquelas com HSIL foram positivas para HPV. Da mesma maneira, no Rio de Janeiro entre 2000 e 2002, das 5833 amostras obtidas de esfregaço cervical, 44,9% foram positivas para HPV, das quais 14,1% apresentavam lesão cervical. Destas, 5,1% apresentavam LSIL e 25,5% HSIL (CARESTIATO et al., 2006). O estudo de coorte Ludwig-McGill acompanhou por 5 anos (1993-1998) mulheres residentes no estado de São Paulo. Este estudo teve como objetivo principal o entendimento da etiopatogênese do câncer cervical, sendo considerado entre os de maior importância para a compreensão do câncer de colo do útero, de grande impacto para o perfil epidemiológico da população brasileira frente a esta patologia. A prevalência da infecção por HPV encontrada por esse grupo foi de 13,8%, com risco relativo de 5,8 (intervalo de confiança 95%: 3,0–11,1) (FRANCO et al., 1999).

No presente estudo, foram coletadas amostras cervicais de 140 mulheres residentes no município de Vitória da Conquista, região sudoeste da Bahia, Nordeste do Brasil. Após a exclusão de uma amostra, das 139 restantes, 70 apresentavam citologia normal e 17 dessas mulheres (24,3%) foram positivas para HPV. Apesar da infecção pelo HPV ser um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical, nem todos os casos de infecção pelo vírus resultarão em lesões. Além disso, esta detecção viral é considerada comum na população. No exame citológico de rotina, entre as mulheres com citologia normal, cerca de 10 a 30% são positivas para algum tipo de HPV (BOSCH et al., 2002; BOSCH; DE SANJOSÉ, 2007; ZUR HAUSEN, 2009). Em revisão realizada por Baseman e Koutsky, (2005), observou-se que esta percentagem pode ser estendida de 2 a 44%, pois é variável entre as regiões.

A elevada detecção de HPV em pacientes com citologia normal e os baixos índices de lesões precursoras do câncer cervical quando comparado com a alta prevalência de HPV na população em geral, favorece-se a hipótese de que, apesar de necessário, apenas a presença do HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer. Outros fatores têm sido relacionados com o desenvolvimento das lesões cervicais, dentre elas a coinfeção com outros microrganismos (IARC-Monographs, 2012). No presente estudo, a detecção de *Mollicutes*, *U. parvum* e seus sorotipos, *U.*

urealyticum, *T. vaginalis* e *G. vaginalis*, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi comparada quanto a sua possível associação com as lesões cervicais.

A prevalência para *Mollicutes* foi de 66,3% na população do presente estudo. Entre aquelas com lesão cervical 57% mulheres foram positivas. Mulheres infectadas com *Mollicutes* apresentaram risco 5,9 vezes maior de apresentar quaisquer lesões.

A classe *Mollicutes* possui mais de 200 espécies distribuídas entre diferentes hospedeiros, dos quais os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são os principais relacionados com distúrbios em humanos. O crescimento lento destas bactérias na superfície de células hospedeiras tem o potencial de causar estresse celular. A complexa diversidade na relação parasito-hospedeiro adicionado pelo mosaico antigênico destas bactérias, desencadeiam vários efeitos imunomoduladores. Os efeitos são variados e não específicos sobre as células imunocompetentes que resulta em supressão ou estímulo policlonal de linfócitos B e T incluindo-se algumas citocinas. A aderência às células do hospedeiro pelas adesinas, produção de nucleases, peróxido de hidrogênio ou amônia do metabolismo primário e o escape da resposta imune pela variação antigênica bacteriana contribuem na patogênese dos micoplasmas. Este conjunto de atividades imunomoduladoras permite o estabelecimento de uma infecção crônica, persistente (LEE, 2009; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998;). A persistência da resposta inflamatória é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais (IARC, 2007). Dessa forma, estudos “in vitro” e “in vivo” da resposta inflamatória do hospedeiro com tais microrganismos são importantes na compreensão da biologia dos *Mollicutes*.

No presente estudo, foram estudadas duas espécies de *Mollicutes*: *U. urealyticum* e *U. parvum*, em mulheres com lesão e em mulheres com citologia cervical normal. Adicionalmente, células PHK foram infectadas com ambos ureaplasmas.

A detecção dos ureaplasmas nos materiais clínicos estudados, foi mais frequente pela metodologia da qPCR do que a PCR convencional. *U. parvum* foi detectado em 57,3% e *U. urealyticum* em 52,6% entre mulheres que apresentavam lesão cervical. Entretanto, a detecção de *U. parvum* demonstrou associação positiva com a presença de lesão cervical. Ekiel et al. (2009) realizaram um estudo semelhante. Avaliaram 182 mulheres com alterações no colo do útero: 67 mulheres com ASCUS, 49 mulheres com LSIL, 22 com HSIL, 39 com citologia normal e 5 com câncer invasivo. Sessenta e quatro 64 (35,2%) foram positivas para *Mollicutes*, mas

58 (90,7%) foram positivas para *U. parvum* e 9 (14,1%) para *U. urealyticum*. Verificaram também que os ureaplasmas foram mais frequentes entre mulheres com HSIL. Em outro estudo realizado por Lukic et al. (2006), foram estudadas 239 mulheres com diferentes distúrbios na região do colo do útero: 66 com células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), 115 com lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e 58 com lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL). Não realizaram diagnóstico para *U. parvum*. Porém, observaram que entre as mulheres com diagnóstico de HSIL, 26 (45%) foram positivas para *U. urealyticum*. No presente estudo, houve maior detecção de *U. parvum* (65,5%) que *U. urealyticum* (60,0%) entre mulheres com HSIL. A detecção de *U. parvum* apresentou associação positiva com a presença de lesões de alto grau (HSIL). Assim, ureaplasmas indicam envolvimento para a ocorrência de lesões de alto grau. No entanto, existem poucos dados na literatura da relação entre ureaplasmas e HPV. De acordo com Kong et al. (2000), *U. parvum* é mais frequente em isolados clínicos da região genital do que *U. urealyticum*. Contudo, a maior percentagem de detecção de *U. parvum* e *U. urealyticum* nos materiais clínicos por qPCR é pela sua maior sensibilidade. Esta metodologia detecta menor carga microbiana do que a PCR convencional.

A patogenicidade entre as espécies de ureaplasma ainda não são conhecidas. Estes ureaplasmas foram separados em biovars 1 e 2 da única espécie anteriormente reconhecida de origem humana, *U. urealyticum* com 14 sorotipos. Essa divisão foi possível pelas diferenças em quatro regiões gênicas. Os genes 16S rRNA; as regiões espaçadoras dos genes 16S-23S rRNA; as subunidades ureA, ureB e ureC parcial do gene da urease e regiões adjacentes à montante (*upstream*) de ureA, espaçador de ureA-ureB e espaçador de ureB-ureC; e as extremidades 5' dos genes de MBA genes (KONG et al. 1999). Contudo, os estudos devem se estender para definir se as diferenças entre os genes são capazes de causar variações nos mecanismos de patogenidades destes ureaplasmas.

Existem também diferenças entre os sorotipos dentro de uma mesma espécie. *U. parvum*, com os sorotipos 1, 3, 6 e 14 possuem heterogeneidade nas regiões finais 5' dos genes de MBA. A sequência gênica do sorotipo 3 difere apenas por três bases do sorotipo 14, sendo portando estudados como um único sorotipo; contudo, existem diferenças significativas entre as sequências dos sorotipos 3 e 14 dos outros sorotipos (1 e 6) (KONG et al., 1999). Como o MBA de *Ureaplasma* spp. são os principais

imunógenos reconhecidos durante a infecção, diferenças nas sequências dos sorotipos podem conferir variações nos mecanismos de patogenicidade, bem na resposta do hospedeiro frente ao agente. Desta maneira, explicam-se as diferenças encontradas no presente estudo. Entre os quatro sorotipos de *U. parvum*, 3 e 14 apresentaram maior detecção entre todos os sorotipos, mas foram detectados tanto entre o grupo de mulheres com lesão quanto no grupo de mulheres sem lesão, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Entretanto, os sorotipos 1 e 6 de *U. parvum* foram menos detectados entre as mulheres com lesão, e apresentaram associação negativa com a presença das lesões cervicais. De acordo com a literatura, os sorotipos 3 e 14 são os mais detectados entre os isolados clínicos (EKIEL et al., 2009; KONG et al., 2000). Além disso, como a detecção dos sorotipos foi obtida por PCR convencional, não foi possível observar a carga microbiana de cada um dos sorotipos nas amostras estudadas, uma vez que a carga de microrganismos numa amostra clínica provocar uma resposta inflamatória maior.

Mulheres com lesão cervical apresentaram carga maior de *U. parvum* ($\sim 6,5 \times 10^5$ UFC/ μ l) do que as mulheres sem lesão ($\sim 7,5 \times 10^4$ UFC/ μ l), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a carga de *U. urealyticum* entre mulheres com lesão (~ 30 UFC/ μ l) e sem lesão (~ 28 UFC/ μ l) cervical. Maior carga de microrganismos no local da lesão pode provocar uma resposta inflamatória local mais intensa. Desta maneira favorece a persistência da infecção e o estabelecimento das lesões cervicais.

Poucos estudos foram encontrados que relacionem a carga de ureaplasmas com distúrbios no aparelho genital, principalmente com lesões cervicais precursoras de câncer de colo do útero (XIAOLEI et al., 2014). Liu et al. (2014) relacionaram a carga de *U. parvum* e *U. urealyticum* em mulheres que apresentavam cervicite, e encontraram relação de risco positiva entre a carga microbiana e a cervicite. Em estudo realizado por Yoshida et al. (2007), foi encontrada associação entre maior carga de *U. urealyticum* e a presença de UNG-NC em homens, mas não observaram o mesmo para *U. parvum*. Verificou-se também em outros estudos a relação causal entre a carga de ureaplasmas e a doença (DEGUCHI et al., 2014; SHIMADA et al., 2014). Apesar dos estudos não serem relacionados à lesão cervical, acreditamos que a carga dos ureaplasmas influenciar a ocorrência das primeiras alterações na formação das lesões cervicais.

Outros microrganismos de importância genital também foram detectados. *T. vaginalis* foi detectada em 62,0% das mulheres que apresentavam lesão. Houve associação positiva com sua presença e o desenvolvimento de lesão cervical, com maior detecção (28%) em mulheres com lesões de alto grau. Zhang et al. (1995) também obtiveram associação positiva entre *T. vaginalis* e a presença de lesão cervical. Foram analisadas 16.797 residentes em Jingan, China, as quais foram acompanhadas entre 1974 a 1985. O risco encontrado foi de 3,31 (I.C.95%= 1,5 – 7,4). Por outro lado, Lukic et al. (2006) obtiveram baixa detecção desse microrganismo entre as mulheres testadas. Apenas 1% de mulheres com LSIL foram positivas para *T. vaginalis*, e entre aquelas com HSIL não houve detecção, e não foi encontrada associação estatisticamente significativa. Verteramo et al. (2009) também obtiveram baixa detecção desse microrganismo (1,16%). No presente estudo, *G. vaginalis* foi detectada em 92,0% de todas as mulheres que apresentavam lesão, onde foi encontrada uma associação positiva com a presença de lesão. Apresentou maior detecção entre aquelas com HSIL. Em estudo realizado na Holanda entre 1991 a 2006, foram obtidas amostras cervicais de 800.498 mulheres. Também encontraram associação positiva entre a presença do microrganismo e a presença de lesão cervical (KLOMP et al., 2008). *C. trachomatis* foi detectada em apenas 4% das mulheres e *N. gonorrhoeae* não foi detectada entre mulheres com lesão cervical. Estes dois microrganismos não foram associados, no presente estudo, com lesão cervical. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para o melhor entendimento da associação desses microrganismos com a presença do câncer cervical.

No Nordeste, o câncer cervical é o segundo mais incidente (INCA, 2014). O Nordeste apresenta os menores índices de desenvolvimento humano entre municípios (IDHM) quando comparado com o restante do Brasil (PNUD, Ipea, FJP, 2013). No presente estudo, além da detecção dos microrganismos, foi analisado alguns fatores relacionados ao perfil socioeconômico e do comportamento sexual, por meio do questionário aplicado nas mulheres residentes no município de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Algumas variáveis apresentaram associação positiva com a presença de lesão cervical. De acordo com os dados obtidos do último Censo (IBGE, 2010) e apresentados pelo Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil (PNUD, Ipea e FJP, 2013), Vitória da Conquista é um dos maiores municípios da Bahia. Possui 306.866 habitantes, com estimativa para 2014 de 340.199 habitantes, ocupando a terceira

posição no estado quanto ao número de habitantes. Apesar de ser considerada a quinta maior economia entre os municípios baianos (SEI, 2015) Vitória da Conquista apresenta IDHM de 0,678 (numa faixa que varia de 0 a 1), ocupando a 16ª posição entre os 417 municípios baianos e a 2481ª posição no Brasil em relação aos 5.565 municípios brasileiros, de acordo com o IDHM 2010 (PNUD, Ipea e FJP, 2013). Dessa forma, a população do município ainda possui baixas condições de saúde, renda e educação, principalmente na zona rural do município. No presente estudo, mulheres que viviam no campo apresentaram risco 2,6 vezes maior (I.C.95% 1,13-6,10) de desenvolver lesões no colo do útero quando comparado com aquelas que residiam na cidade. Residir em zona rural também foi relacionado como um fator de risco ao desenvolvimento do câncer cervical no estudo realizado por Mendonça et al. (2010) entre mulheres residentes nas zonas rural e urbana de Recife, Pernambuco. Além disso, mulheres com mais de um parceiro ao longo da vida apresentaram maior risco de desenvolver lesão cervical (O.R.=2,125, I.C. 95%= 1,038-4,349). Ter vida sexual ativa apresentou-se como fator de proteção para a ocorrência de lesões. Esse fato é contrário com a ideia da infecção pelo HPV por via sexual. No pareamento pela idade, verificou-se que as muitas mulheres com lesão no presente estudo possuem mais idade e não possuem vida sexualmente ativa quando comparado com o grupo controle. Ao analisar a variável idade, foi observado que mulheres com mais de 30 anos possuem risco 2,8 vezes maior (I.C. 95%= 1,275-6,179) de desenvolver lesão comparando-se com mulheres com menos de 30 anos. Isso ocorre porque a maioria das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regride espontaneamente, ao passo que, acima dessa idade, a persistência é mais frequente (INCA, 2014). Além desse fator, mulheres que relataram não ter relacionamento estável (por serem viúvas, divorciadas, ou por manter relação sexual ocasionalmente) apresentaram chance menor de desenvolver lesão cervical comparando-se àquelas que possuem relacionamento estável (casadas, namoro ou noivado, ou que mantêm união estável). Isso pode ser explicado porque, estando em um relacionamento estável, muitos parceiros não usam preservativo com suas companheiras e, ao manterem relacionamentos extraconjugais, poderiam contrair o vírus HPV e infectar suas esposas (BOSCH; QIAO; CASTELLSAGUÉ, 2006).

Com a finalidade de compreender os mecanismos de patogenicidade dos ureaplasmas na região cervical, também foi realizado um estudo “in vitro”. Para isso,

foi realizada a inoculação de *U. urealyticum* e *U. parvum* em dois grupos de células: células PHK transduzidas com vetor pLXSN vazio (“sem HPV”) e células PHK transduzidas com vetor pLXSN contendo os genes E6 e E7 de HPV 16 (“com HPV”). O objetivo foi verificar se tais microrganismos podem induzir alteração no crescimento das células devido a algum efeito citopático, e provocarem a liberação de algumas citocinas. Em relação à curva de crescimento das células, tanto o grupo de células “com HPV” quanto o grupo “sem HPV” infectados com ureaplasmas apresentaram diminuição no número de células com o tempo, quando comparado com os grupos não infectados. Não existem dados na literatura utilizando infecção experimental com HPV e ureaplasmas em queratinócitos primários. Acreditamos que essa diminuição no número de células infectadas com ureaplasmas possa estar relacionada com o processo de indução de apoptose. Em estudo realizado por Shang et al. (1999), células espermato gênicas de ratos da raça Han infectadas ou não com *U. urealyticum* foram coletadas, coradas por Wright-Giemsa e observadas em microscópio óptico; além disso, as células foram submetidas à técnica de TUNEL para verificar apoptose. Observou-se que houve mais apoptose entre as células infectadas *U. urealyticum*. Em outro estudo realizado por Li et al. (2002), foram realizadas infecções por *U. urealyticum* em células epiteliais pulmonares tipo II (linhagem celular A549) e em macrófagos (derivados da linhagem celular monocítica humana THP-1). Para observar a apoptose das células, foram utilizadas diversas técnicas. Para verificar a morfologia das células foi realizada a coloração com hematoxilina-eosina. Além disso, foi verificada a fragmentação do DNA das células infectadas. Por fim, as células foram marcadas com Anexina V associada ao fluoróforo FITC e, em seguida, analisadas em citômetro de fluxo para verificar a translocação dos fosfolipídios de membrana. Pela análise de todas as técnicas, foi possível concluir que houve mais células entraram em apoptose no grupo infectado por *U. urealyticum*. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese e observar quais outros mecanismos possam estar envolvidos. Estudos revelam que *U. urealyticum* e *U. parvum* estão presentes em diversos distúrbios genitais, mas também nos indivíduos saudáveis. (GDOURA et al., 2007; GLASS et al., 2000; HARADA et al., 2008; UUSKÜLA; KOHL, 2002;). Os ureaplasmas interagem e colonizam a superfície mucosa do trato urogenital se ligando à membrana plasmática do hospedeiro, causando danos celulares pela produção de radicais superóxido. Além disso, as fosfolipases de

ureaplasmas podem interagir com a membrana plasmática da célula hospedeira, sendo um fator de virulência significativo (DE SILVA; QUINN, 1991; KONDRATYEVA et al., 2013). Allam et al. (2011) relataram tentativas de compreender quais mecanismos de virulência estão envolvidos em animais infectados por *U. parvum*. Verificaram que camundongos infectados com *U. parvum* apresentavam concentração baixa de filamina A, proteína ligada à diferenciação celular, apoptose e inflamação. Observaram também que houve alteração em outras proteínas que normalmente regulam a polimerização da actina durante o crescimento celular e também na motilidade celular nos eventos inflamatórios.

Outro fator de patogenicidade é a liberação de amônia pelos ureaplasmas, produto do metabolismo da ureia. A amônia é tóxica para a célula do hospedeiro. Isto explicaria as menores quantidades de células nos grupos celulares infectados no presente estudo. Além disso, ureaplasmas podem produzir hemolisinas, proteínas com caráter hemolítico e citotóxico (POLLACK, 2001; RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Com a finalidade de entender a resposta inflamatória das células frente a infecção pelos ureaplasmas, foram dosadas as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos diferentes tempos de infecção celular. Não detectou-se diferença na liberação de IL-1 β , mas houve maior liberação de IL-6 e TNF- α para ambos ureaplasmas, pelo menos após 48 horas da infecção. De maneira geral, IL-6 apresentou maiores títulos nos grupos de células que expressam proteínas do HPV. Alguns estudos também relatam aumento da liberação de citocinas por células infectadas por *U. urealyticum* e *U. parvum*. Em estudo realizado por Li et al. (2000), observaram que *U. urealyticum* foi capaz de aumentar a liberação de TNF- α e IL-6 por uma linhagem de macrófagos humanos (THP-1). Triantafilou et al. (2013) também observaram que *U. urealyticum* e *U. parvum* foram capazes de aumentar a liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em células epiteliais amnióticas humanas. Além disso, *U. urealyticum* e *U. parvum* também têm sido relacionados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias em distúrbios pulmonares de recém-nascidos, bem como nos distúrbios reprodutivos (VOLGMANN; OHLINGER; PANZIG, 2005; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). O estímulo para liberação de citocinas pode ser pelo reconhecimento celular de lipoproteínas associadas à membrana (LAMPs) presentes em *Mollicutes*. As LAMPs foram descritas em algumas espécies como potentes estimuladores do sistema imune (ROTTEM, 2003). Além disso, as LAMPs podem iniciar diretamente a sinalização apoptótica das células pela

interação com *Toll-like receptors* tipos 2 e 6 (TLR2 e TLR6), o que explicaria o menor número de células no ensaio da curva de crescimento (YOU et al., 2006).

A liberação de citocinas pro-inflamatórias pelas células causadas pela infecção por ureaplasmas pode ser um evento inicial das alterações celulares que culminam com lesões cervicais. O dano contínuo no local da infecção poderia levar a danos genotóxicos nas células, favorecendo a mutação (CHOI; ROH, 2014; LUKIC et al., 2006). A associação de *Mollicutes* e *U. parvum* com as lesões cervicais no estudo epidemiológico aumenta a força argumentativa dessa hipótese. Os ureaplasmas poderiam contribuir com HPV no estabelecimento das lesões cervicais. As infecções por micoplasmas são consideradas frequentes. Assim poderiam colonizar precocemente a região genital, levando a resposta inflamatória local e contribuindo com o processo de lesão celular. Além dos estudos epidemiológicos têm associado a presença de *U. urealyticum* e/ou de *U. parvum* com a presença de lesões precursoras de câncer cervical (ELHADI-FARAG et al., 2013; LUKIC et al., 2006). Em estudo recente por Szostek et al. (2014), observou-se que *U. urealyticum* e *U. parvum* aumentaram a expressão da proteína E6 de HPV 16 em células de linhagem SiHa, após serem infectadas pelos microrganismos, sendo um indício adicional da cooperação dos ureaplasmas com o estabelecimento das lesões.

Mesmo que seja evidente o papel do HPV no desenvolvimento do câncer de colo do útero, a complexidade e o perfil multifatorial desta patologia requer a continuidade destes estudos. Quando todos os pontos envolvidos na etiogênese da doença são conhecidos, aumentam-se as possibilidades de melhoria nas estratégias de prevenção e tratamento. Como um dos possíveis fatores associados à gênese das lesões cervicais é a coinfeção com outros microrganismos, estudos que visem a compreensão da microbiota natural e transitória vaginal têm sido amplamente difundidos no campo médico, e têm se tornado necessários para a compreensão de diversas desordens que acometem o ser humano (RAVEL et al., 2011; ROMERO et al., 2014; ZHOU et al., 2010;). Apesar das evidências apontadas no presente estudo sobre o papel dos ureaplasmas nas lesões, estudos longitudinais com maior grupo populacional devem ser realizados para definir com precisão a sua associação com o surgimento da lesão cervical. Além disso, a realização de ensaios de infecção em modelos de estudo “in vitro” e “in vivo” contribuiriam para elucidar os fatores de virulência envolvidos no estabelecimento das lesões cervicais. Os dados obtidos são

inéditos na população estudada, permitindo aos gestores do município o aprimoramento das medidas de prevenção e tratamento presentes atualmente, com a finalidade de melhorar os índices de qualidade de vida da população feminina residente no município de Vitória da Conquista, Bahia.

7 CONCLUSÕES

- A metodologia de qPCR apresentou maior sensibilidade do que a PCR convencional na detecção das espécies *U. urealyticum* e *U. parvum* em amostras de swab vaginal.
- Houve elevada prevalência de HPV entre as mulheres estudadas.
- Foram encontradas associações estatisticamente significantes entre a presença de HPV, *Mollicutes*, *U. parvum*, sorotipos 1 e 6 de *U. parvum*, *Trichomonas vaginalis* e *Gardnerella vaginallis* e as lesões cervicais.
- De acordo com o levantamento do perfil demográfico das mulheres estudadas, ter a idade maior de 30 anos e residir na zona rural do município de Vitória da Conquista, Bahia, estão associados com a presença de lesões cervicais.
- De acordo com o comportamento e saúde sexuais das mulheres estudadas, fatores como: relacionamento estável, vida sexual ativa e número de parceiros na vida estão associados com a presença de lesão cervical entre as mulheres participantes do estudo.
- A carga microbiana de *U. parvum* foi maior entre as mulheres com lesão cervical. Não houve diferença na carga de *U. urealyticum* entre as mulheres com e sem lesão cervical.
- No modelo de infecção “in vitro”, houve diferença estatisticamente significativa no número de células infectadas com *U. urealyticum* e *U. parvum* entre os diferentes grupos (com “HPV” e sem “HPV”).
- Entre as células “sem HPV” infectadas por ureaplasmas, houve diminuição no número de células após infecção por *U. urealyticum*, quando comparado com o grupo não infectado.
- Entre as células “com HPV”, houve diminuição no número de células transduzidas após infecção por *U. urealyticum* e *U. parvum*, quando comparado com o grupo não infectado.

- Entre os diferentes grupos de células (“com HPV” e “sem HPV”), não houve diferença na liberação de IL-1 β entre as células infectadas e não infectadas por ureaplasmas.
- Houve maior liberação de IL-6 entre as células “com HPV” infectadas com *U. urealyticum* e por *U. parvum* quando comparado com o grupo não infectado.
- Entre as células “sem HPV”, apresentou-se maior quantidade de IL-6 após infecção por *U. parvum* quando comparado com o grupo não infectado.
- A respeito da citocina TNF- α , células “com HPV” infectadas com *U. urealyticum* apresentaram maior liberação da citocina do que o grupo controle
- Entre as células “sem HPV”, houve maior liberação de TNF- α entre as células infectadas com *U. urealyticum* quando comparado com o grupo controle.

REFERÊNCIAS*

ALLAM, A. B. et al. Ureaplasma parvum infection alters filamin A dynamics in host cells. **BMC. Infect. Dis.**, v. 11, p. 101, 2011.

AYRES A.R.G.; SILVA, G.A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Públ.**, v. 44, p. 963-974, 2010

BAKER, T. S. et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophys. J.**, v. 60, n. 6, p. 1445-1456, 1991.

BASEMAN, J. B. et al. Interplay between mycoplasmas and host target cells. **Microb. Pathog.**, v. 19, n. 2, p. 105-116, 1995.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J. Clin. Virol.**, v. 32 Suppl 1, p. S16-24, 2005.

BENDJENNAT, M. et al. Role of Mycoplasma penetrans endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4456-62, 1999.

BERGEY'S. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: _____. 2. ed. **Manual of Systematic Bacteriology** New York: Springer-Verlag, 2010. v.4. 721 p.

BERNARD, H. U. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. **Infect. Genet. Evol.**, v. 18, p. 357-361, 2013.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

BIERNAT-SUDOLSKA, M. et al. Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. **Adv. Med. Sci.**, v. 56, n. 2, p. 299-303, 2011.

BOCCARDO, E. et al. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 521-531, 2010.

_____. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology**, v. 328, n. 2, p. 233-243, 2004.

BORNSTEIN, J.; RAHAT, M. A.; ABRAMOVICI, H. Etiology of cervical cancer: current concepts. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 50, n. 2, p. 146-154, 1995

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Dis. Markers.**, v. 23, n. 4, p. 213-227, 2007.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, n. 4, p. 244-265, 2002.

BOSCH, F. X.; QIAO, Y.-L.; CASTELLSAGUÉ, X. CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 94, n. Supplement 1, p. S8-S21, 2006.

BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **EMBO. J.**, v. 3, n. 5, p. 1151-1157, 1984.

BOVÉ, J. M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. **Res. Microbiol.**, v. 150, n. 4, p. 239-245, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2006. 56 p.

_____. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. **Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais**. 3.ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 23 p.

BROWN, D. R.; WHITCOMB, R. F.; BRADBURY, J. M. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, n. Pt 11, p. 2703-2719, 2007.

CAMPOS, E. A. et al. Recovery of DNA for the detection and genotyping of human papillomavirus from clinical cervical specimens stored for up to 2 years in a universal collection medium with denaturing reagent. **J. Virol. Methods.**, v. 147, n. 2, p. 333-337, 2008.

CAO, X. et al. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 4, p. 373-378, 2007.

CARESTIATO, F. N. et al. Prevalence of human papillomavirus infection in the genital tract determined by hybrid capture assay. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 5, p. 331-336, 2006.

CARTER, J. R.; DING, Z.; ROSE, B. R. HPV infection and cervical disease: a review. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 51, n. 2, p. 103-108, 2011.

CASSELL, G. H. et al. Ureaplasma urealyticum intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 1, p. 69-87, 1993.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus. Res.**, v. 89, n. 2, p. 191-199, 2002.

CASTLE, P. E.; GIULIANO, A. R. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. **J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.**, n. 31, p. 29-34, 2003.

CASTLE, P. E. et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 10, p. 1021-1027, 2001.

CHEN, X. S. et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Mol. Cell.**, v. 5, n. 3, p. 557-567, 2000.

CHOI, Y.; ROH, J. Cervical cytopathological findings in Korean women with Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, and Ureaplasma urealyticum infections. **Sci. World. J.**, v. 2014, p. 756-713, 2014.

CLIFFORD, G. M. et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 991-998, 2005

_____. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br. J. Cancer.**, v. 89, n. 1, p. 101-105, 2003.

DE SILVA, N.S.; QUINN, P.A.. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in Ureaplasma urealyticum. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1498-1503, 1991.

DEGUCHI, T. et al. Bacterial loads of Ureaplasma parvum contribute to the development of inflammatory responses in the male urethra. **Int. J. STD. AIDS**, v.1, 2014

DE FRANCESCO, M. A. et al. Detection of Ureaplasma biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of Ureaplasma parvum in women with or without symptoms of genital infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, n. 6, p. 641-646, 2009.

DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 7, p. 453-459, 2007.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DEODHAR, K. et al. Prevalence of human papillomavirus types in cervical lesions from women in rural Western India. **J. Med. Virol.**, v. 84, n. 7, p. 1054-1060, 2012.

DIENES, L. L. Organisms of KLIENEGER and Streptobacillus moniliformis. **J. Infect. Dis.**, v. 65, n. 1, p. 24-42, 1939.

DIENES, L.; EDSALL, G. Observations on the L-Organism of KLIENEGER. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 36, n. 5, p. 740-744, 1937.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006.

DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934-7, 1989.

DÜRST, M. et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, n. 12, p. 3812-3815, 1983.

EKIEL, A. M. et al. Occurrence of Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum in women with cervical dysplasia in Katowice, Poland. **J. Korean. Med. Sci.**, v. 24, n. 6, p. 1177-1181, 2009.

ELHADI-FARAG, M. A. et al. Association between genital mycoplasma and cervical squamous cell atypia. **Middle. East. Fertil. Soc. J.**, v. 18, n. 4, p. 241-245, 2013.

ELUF-NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **Br. J. Cancer**, v. 69, n. 1, p. 114-119, 1994.

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

FORD, D. K. Inhibition of growth of T-strain mycoplasmas by hydroxamic acids and by aurothiomalate. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 2, n. 5, p. 340-343, 1972.

FRANCESCHI, S. et al. Cervical infection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in women from ten areas in four continents. A cross-sectional study. **Sex. Transm. Dis.**, v. 34, n. 8, p. 563-569, 2007.

FRANCO, E. et al. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev. Panam. Salud. Publica.**, v. 6, n. 4, p. 223-233, 1999.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 46-54, 2004.

GARFIELD, E. All Sorts of Warts-Separating Fact from Fiction. Part 1. Etiology, Biology, and Research Milestones. **Current Comments**, v. 9, p. 3-9, 1988.

GDOURA, R. et al. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. **BMC Infect. Dis.**, v. 7, p. 129, 2007.

GISSMANN, L. et al. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, n. 2, p. 560-563, 1983.

GLASS, J. I. et al. The complete sequence of the mucosal pathogen Ureaplasma urealyticum. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 757-762, 2000.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GUIJON, F. et al. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 37, n. 3, p. 185-191, 1992.

HARADA, K. et al. Vaginal infection with Ureaplasma urealyticum accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. **Microbiol. Immunol.**, v. 52, n. 6, p. 297-304, 2008.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006.

HERRERO, R. et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 92, n. 6, p. 464-474, 2000.

HO, B. S. et al. Polymerase chain reaction for the detection of Neisseria gonorrhoeae in clinical samples. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 5, p. 439-442, 1992.

IARC. Human Papillomaviruses - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: **IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 90, 2007.

_____. **GLOBOCAN 2012 - Cervical Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** [Lyon: IARC, 2012a. 4 p.]

_____. **GLOBOCAN 2012 – Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.** [Lyon: IARC, 2012b. 5 p.]

IARC-MONOGRAPH. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - A review of human carcinogens. Part B: Biological agents.** Lyon, France: 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. [Bahia: Vitória da Conquista: síntese das informações]. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=293330&idtema=16&search=||s%EDntese-das-informa%E7%F5es>> Acesso em 07 de janeiro de 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 p.

JENSEN, J. S.; BLOM, J.; LIND, K. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 75, n. 2, p. 91-98, 1994.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr. Cancer. Drug. Targets.**, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.

KITA, M. et al. Induction of interleukins by mycoplasma in culture of human mononuclear leukocytes. **C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.**, v. 184, n. 5-6, p. 380-384, 1990.

KLIENEBERGER, E. Pleuropneumonia-like organisms of diverse provenance: some results of an enquiry into methods of differentiation. **J. Hyg. (Lond)**, v. 38, n. 4, p. 458-476, 1938.

KLOMP, J. M. et al. Cytologically diagnosed *Gardnerella vaginalis* infection and cervical (pre)neoplasia as established in population-based cervical screening. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 199, n. 5, p. 480. e1-5, 2008.

KONDRATYEVA, Y.S. et al. Causative Role of *Ureaplasma Urealyticum* and other Sexually Transmitted Infections in the Urethral Meatus Polyp Development in Women. **International Journal of BioMedicine** v. 3, p. 170-173, 2013.

KONG, F. et al. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*--support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49 Pt 4, p. 1879-1889, 1999.

_____. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1175-1179, 2000.

KRAUSE, D. C. et al. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 3, p. 809-817, 1982.

KUNDSIN, R. B. et al. Chromosomal aberrations induced by T strains mycoplasmas. **J. Med. Genet.**, v. 8, n. 2, p. 181-187, 1971.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 211-222, 2004.

KYO, S. et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. **Virology**, v. 200, n. 1, p. 130-139, 1994.

LI, Y. H. et al. Ureaplasma urealyticum-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. **Pediatr. Res.**, v. 48, n. 1, p. 114-119, 2000.

LI, Y.H. et al. Ureaplasma urealyticum induces apoptosis in human lung epithelial cells and macrophages. **Biol. Neonate.** v. 82, p. 166-173, 2002.

LIU, L. et al. High bacterial loads of Ureaplasma may be associated with non-specific cervicitis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 46, p. 637–641, 2014

LEE, N. **Characterization of an ATP-binding cassette (ABC) transport system involved in nucleoside uptake in Mycoplasma bovis strain M23, and discovery of its pathogenicity genes.** 2009. Graduate Theses and Dissertations. Paper 10807. Veterinary Preventive Medicine, Epidemiology, and Public Health Commons. Iowa State University, Iowa, 2009. Disponível em: <<http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1823&context=etd>> Acesso em 16 de janeiro de 2015

LO, S. C. et al. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by mycoplasma penetrans: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. **Mod. Pathol.**, v. 6, n. 3, p. 276-280, 1993.

LUKIC, A. et al. Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: the role of Ureaplasma urealyticum. **Anticancer. Res.**, v. 26, n. 6C, p. 4843-4849, 2006.

MAHONY, J. B. et al. Chlamydia trachomatis confirmatory testing of PCR-positive genitourinary specimens using a second set of plasmid primers. **Mol. Cell. Probes.**, v. 6, n. 5, p. 381-388, 1992.

MANILOFF, J. et al. **Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.** Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992. 609 p.

MARQUES, L. M. et al. Invasion of Ureaplasma diversum in Hep-2 cells. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 83, 2010.

MCGOWIN, C. L.; POPOV, V. L.; PYLES, R. B. Intracellular Mycoplasma genitalium infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 139, 2009.

MCMURRAY, H. R. et al. Biology of human papillomaviruses. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, n. 1, p. 15-33, 2001.

MENDONÇA, V. G. D. et al. Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 32, n. 10, p. 476-485, 2010.

MERNAUGH, G. R. et al. Properties of adhering and nonadhering populations of Mycoplasma genitalium. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17 Suppl 1, p. S69-78, 1993.

MGONE, C. S.; LUPIWA, T.; YEKA, W. High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and multiple sexually transmitted diseases among rural women in the Eastern Highlands Province of Papua New Guinea, detected by polymerase chain reaction. **Sex. Transm. Dis.**, v. 29, n. 12, p. 775-779, 2002.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.

MS/INCA. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). **Falando sobre câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002. 59 p.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

_____. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. **Int. J. Cancer**, v. 52, n. 5, p. 743-749, 1992.

NOCARD; R. The microbe of pleuropneumonia. 1896. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 354-358, 1990.

OLSON, L. D. et al. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism: a ¹³C-NMR study. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 108, n. 1, p. 47-52, 1993.

ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **Br. J. Vener. Dis.**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 1971.

PADMINI, E.; UTHRA, V. Role of *Ureaplasma urealyticum* in altering the endothelial metal concentration during preeclampsia. **Placenta**, v. 33, n. 4, p. 304-311, 2012.

PNUD, Ipea, FJP, 2013 - Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil. Disponível em: <http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/perfil_m/vitoria-da-conquista_ba> Acesso em 07 de janeiro de 2015

POLLACK, J. D. *Ureaplasma urealyticum*: an opportunity for combinatorial genomics. **Trends. Microbiol.**, v. 9, n. 4, p. 169-175, 2001.

POLLACK, J. D.; WILLIAMS, M. V.; MCELHANEY, R. N. The comparative metabolism of the mollicutes (*Mycoplasmas*): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 269-354, 1997.

PURCELL, R. H. et al. Color test for the measurement of antibody to T-strain mycoplasmas. **J. Bacteriol.**, v. 92, n. 1, p. 6-12, 1966.

RAMÍREZ-SALAZAR, E. et al. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. **Viol. J.**, v. 8, p. 247, 2011.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108 Suppl 1, p. 4680-4687, 2011.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 42, n. 2, p. 414-470, 1978.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. **Biologicals.**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

REYES, L. et al. Rat strains differ in susceptibility to *Ureaplasma parvum*-induced urinary tract infection and struvite stone formation. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 12, p. 6656-6664, 2006.

RILEY, D. E. et al. Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 465-72, 1992.

ROBERTSON, J. A.; CHEN, M. H. Effects of manganese on the growth and morphology of *Ureaplasma urealyticum*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 19, n. 6, p. 857-64, 1984.

ROBERTSON, J. A. et al. Human ureaplasmas show diverse genome sizes by pulsed-field electrophoresis. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 18, n. 6, p. 1451-1455, 1990.

ROBERTSON, J. A.; STEMKE, G. W. Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, n. 5, p. 873-878, 1982.

ROBERTSON, J. A. et al. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (SHEPARD et al. 1974) ROBERTSON et al. 2001. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, n. Pt 2, p. 587-597, 2002.

ROGERS, M. J. et al. Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 4, p. 1160-1164, 1985.

ROMERO, R. et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 4, 2014.

ROSENSHINE, I.; FINLAY, B. B. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. **Bioessays**, v. 15, n. 1, p. 17-24, 1993.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 2, p. 417-432, 2003.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends. Microbiol.**, v. 6, n. 11, p. 436-440, 1998.

SCHEFFNER, M. et al. 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.

SCHIFFMAN, M.; CLIFFORD, G.; BUONAGURO, F. M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. **Infect. Agent. Cancer.**, v. 4, p. 8, 2009.

SCHWARZ, E. et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 111-114, 1985.

SEI – 2014. Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. Disponível em: <http://sim.sei.ba.gov.br/sim/mapa_interativo.wsp> Acesso em 07 de janeiro de 2015.

SHEPARD, M. C. et al. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov.: Proposed Nomenclature for the Human T (T-Strain) Mycoplasmas. v. 24, n. 2, p. 160-171, 1974. Disponível em: < <http://ijs.sgmjournals.org/content/24/2/160.abstract> >.

SHANG, X.J. et al.. *Ureaplasma urealyticum* infection and apoptosis of spermatogenic cells. **Asian. J. Androl.**, v. 1, p. 127-129, 1999.

SHIMADA, Y. et al. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. **Int. J. STD. AIDS.**, v. 25, p. 294-298, 2014.

SMITH, D. G. et al. Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealyticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 11, p. 3253-3258, 1993.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int. J. Cancer.**, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.

SNIJDERS, P. J. et al. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J. Gen. Virol.**, v. 71 (Pt 1), p. 173-181, 1990.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2114-2119, 2002.

SOUZA, R. C. et al. In search of essentiality: Mollicute-specific genes shared by twelve genomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 169-173, 2007.

STEMKE, G. W.; ROBERTSON, J. A. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 5, p. 959-961, 1982.

STRAUSS, M. J.; BUNTING, H.; MELNICK, J. L. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. **J. Invest. Dermatol.**, v. 15, n. 6, p. 433-444, 1950.

STRAUSS, M. J. et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 72, n. 1, p. 46-50, 1949.

SZOSTEK, S. et al. Differences in the expression of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 oncogene mRNA in SiHa cell line inoculated with CMV, HSV or ureaplasmas. **Folia. Biol. (Krakow)**, v. 62, n. 1, p. 73-78, 2014.

TANAKA, R.; ANDACHI, Y.; MUTO, A. Evolution of tRNAs and tRNA genes in *Acholeplasma laidlawii*. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 19, n. 24, p. 6787-6792, 1991.

TAYLOR, B. D. et al. Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery. **Hum. Reprod.**, v. 28, n. 4, p. 942-952, 2013.

TAYLOR-ROBINSON, D.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 498-514, 2011.

TENG, L. J. et al. *Ureaplasma urealyticum* biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 6, p. 1464-1469, 1994.

THOMS, H. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. **Yale J. Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p. 924, 1943.

TOTH, K. F.; HARRISON, N.; SEARS, B. B. Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, n. 1, p. 119-124, 1994.

TRIANTAFILOU, M. et al. Synergic activation of toll-like receptor (TLR) 2/6 and 9 in response to *Ureaplasma parvum* & *urealyticum* in human amniotic epithelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61199, 2013.

TULLY, J. **Methods in Mycoplasmaology V2: Diagnostic Mycoplasmaology**. New York: Elsevier Science, 1983. 464 p.

UUSKÜLA, A.; KOHL, P. K. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. **Int. J. STD. AIDS.**, v. 13, n. 2, p. 79-85, 2002.

VAN KUPPEVELD, F. J. et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Virus taxonomy - 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Saint Louis: Academic Press, 2000. v. 1. 1162 p.

VERTERAMO, R. et al. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, p. 16, 2009.

VOLGMANN, T.; OHLINGER, R.; PANZIG, B. *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 273, n. 3, p. 133-139, 2005.

WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 4, p. 757-789, 2005.

WEISBURG, W. G. et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 12, p. 6455-6467, 1989.

WHO. **Latest world cancer statistics - Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed.** 2013. Disponível em: < http://www.IARC.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf >. Acesso em 09 de fevereiro de 2015.

WOESE, C. R.; MANILOFF, J.; ZABLEN, L. B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 77, n. 1, p. 494-498, 1980.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

WOODWORTH, C. D.; NOTARIO, V.; DIPAOLO, J. A. Transforming growth factors beta 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. **J. Virol.**, v. 64, n. 10, p. 4767-4775, 1990.

WYRICK, P. B. et al. Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2378-2389, 1989.

XIAOLEI, C. et al. The role of *ureaplasma urealyticum* infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v. 35, n. 5, p. 571-575, 2014.

YOSHIDA, T. et al. Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction. **Sex. Transm. Dis.**, v. 34, n. 6, p. 416-419, 2007.

YOU, X. X.; ZENG, Y. H.; WU, Y. M. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **J. Zhejiang. Univ. Sci. B.** v.7, p.342-350. 2006.

ZARIFFARD, M. R. et al. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 277-281, 2002.

ZHANG, Z. F. et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. **Ann. Epidemiol.**, v. 5, n. 4, p. 325-332, 1995.

HOU, X. et al. Recent advances in understanding the microbiology of the female reproductive tract and the causes of premature birth. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 2010, p. 737425, 2010.

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

_____. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 78, p. 1-30, 1977.

_____. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1288, n. 2, p. 55-78, 1996.

_____. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

_____. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260-265, 2009.

ZUR HAUSEN, H. et al. Human papilloma viruses and cancer. **Bibl. Haematol.**, n. 43, p. 569-571, 1975.

_____. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **Int. J. Cancer.**, v. 13, n. 5, p. 650-656, 1974.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Estudo das interações “in vivo” e “in vitro” da coinfeção entre *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* e o vírus do papiloma humano (HPV).

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, profissão _____,
residente _____ e domiciliado _____ na

_____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido (a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do estudo **“Estudo das interações “in vivo” e “in vitro” da coinfeção entre *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* e vírus do papiloma humano (HPV)”**. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir os possíveis fatores associados ao câncer de colo de útero, os quais serão estudados no projeto: “Estudo das interações “in vivo” e “in vitro” da coinfeção entre *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* e vírus do papiloma humano (HPV)”;
- II) Serão feitas uma coleta com 2 swabs vulvovaginais, em período único.
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

- VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

() Sim ou () Não

- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone 3091.7733 (e-mail: cep@icb.usp.br) ou (11 3091-7297 joti@usp.br) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

() Paciente / () Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone:

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone:

Responsável pelo Projeto: _____

PROF. DR. JORGE TIMENETSKY

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS MESTRADO EM MICROBIOLOGIA					
FICHA DE ATENDIMENTO GINECOLÓGICO					
NÚMERO:			DATA:		
UNIDADE DE SAÚDE:					
NOME (Apenas Iniciais):			IDADE (Anos):		ESCOLARIDADE
REGIÃO: 1. ☐ RURAL 2. ☐ URBANA			ANO DO ÚLTIMO EXAME		
RAÇA/COR: 1. ☐ BRANCA 2. ☐ PRETA 3. ☐ AMARELA 4. ☐ PARDAS 5. ☐ INDÍGENA					
MOTIVO DA CONSULTA:					
HISTÓRIA MENSTRUAL					
MENARCA			DATA DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO		
HISTÓRIA SEXUAL					
IDADE DO 1º INTERCURSO SEXUAL		VIDA SEXUAL ATUAL		RELAÇÃO ESTÁVEL	
		1. ☐ ATIVA 2. ☐ NATIVA		1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	
LIBIDO				ORGASMO	
1. ☐ MANTIDA 2. ☐ PRESENTE 3. ☐ DIMINUÍDA 4. ☐ AUMENTADA				1. ☐ FREQUENTE 2. ☐ RARO 3. ☐ NUNCA	
NÚMERO DE PARCEIROS NA VIDA		NÚMERO DE PARCEIROS (ÚLT. 3 MESES)			
1. ☐ UM 2. ☐ 2 A 5 3. ☐ 6 A 9 4. ☐ 10 OU MAIS		1. ☐ UM 2. ☐ DOIS 3. ☐ TRÊS 4. ☐ QUATRO OU MAIS			
DISPAREUNIA		SINUSIORRAGIA		PRESERVATIVO	
1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO		1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO		1. ☐ SIM SEMPRE 2. ☐ AS VEZES 3. ☐ RARAMENTE	
PÍLULA ANTICONCEPCIONAL		OUTRO MÉTODO CONTRACEPTIVO		4. ☐ NÃO NUNCA	
1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO		1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO		COMO USA? (SOLICITAR DESCRIÇÃO DO USO)	
TEMPO DE USO DE ANTICONCEPCIONAL		CASO A RESPOSTA TENHA SIDO SIM, DESCREVA QUAL:		1. ☐ CORRETAMENTE 2. ☐ INCORRETAMENTE	
HISTÓRICO OBSTÉTRICO					
NÚMERO DE GESTAÇÕES		ABORTAMENTOS			
		ESPONTÂNEOS		PROVOCADOS	
		PARTOS			
		PREMATUROS		A TERMO NATURAIS	
				A TERMO ARTIFICIAIS	
ANTECEDENTES PATOLÓGICOS					
DST (EXCLUIR LESÃO POR HPV)			HIV		
1. ☐ PRÉVIA E TRATADA 2. ☐ DESCONHECE OU NEGA			1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE		
3. ☐ PRÉVIA E NÃO TRATADA					
LESÃO ANTERIOR POR HPV			LESÃO ANTERIOR ASSOCIADA AO HPV		
1. ☐ TRATADA 2. ☐ DESCONHECE OU NEGA			1. ☐ BAIXO GRAU (NIC I) 2. ☐ MODERADA (NIC II)		
3. ☐ NÃO TRATADA			3. ☐ ALTO GRAU (NIC III) 4. ☐ OUTRA. QUAL:		
LESÃO ATUAL POR HPV			LESÃO ATUAL ASSOCIADA AO HPV		
1. ☐ EM TRATAMENTO 2. ☐ TRATADA			1. ☐ BAIXO GRAU (NIC I) 2. ☐ MODERADA (NIC II)		
3. ☐ NÃO TRATADA 4. ☐ DESCONHECE OU NEGA			3. ☐ ALTO GRAU (NIC III) 4. ☐ OUTRA. QUAL:		
OUTRAS INFORMAÇÕES					
FUMANTE		ESCOLARIDADE:		ATIVIDADE FÍSICA	
1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO				1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	
				CASO SIM, QUAL:	
SINTOMATOLOGIA					
1. CORRIMENTO		2. DISÚRIA		3. ODOR	
1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO		1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO		1. ☐ FÉTIDO 2. ☐ CARACTERÍSTICO	
4. DOR PÉLVICA		5. PRURIDO		6. HIPEREMIA	

1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
7. VERRUGA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	8. BOLHA/VEÍCULA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	9. FERIDA/ÚLCERA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
10. PETÉQUIAS 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	OUTRO	
1. PARCEIRO/SINTOMATOLOGIA		1.1 QUEIXA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
1.2 HIPEREMIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.3 CORRIMENTO ANORMAL 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.4 VERRUGA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
1.5 BOLHA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.6 DISÚRIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.7 PRURIDO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
1.8 DISPAREUNIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	OUTRO	
TRATAMENTO		
PARA MENOPAUSA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	ESTROGENIZADA PARA PAPANICOLAU 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	
HISTÓRIA DE TRATAMENTO ANTERIOR		
COMPRIMIDO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	CREME VAGINAL 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	TEMPO 1. ☐ 1 SEMANA 2. ☐ 2 SEMANAS 3. ☐ MAIS DE 2 SEMANAS
INJEÇÃO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	PARCEIRO TRATADO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	RELAÇÃO SEXUAL NO TRATAMENTO 1. ☐ SIM COM CONDON 2. ☐ SIM SEM CONDON 3. ☐ NÃO
2. PARCEIRO/TRATAMENTO		2.1 SABE INFORMAR 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
2.2 PARCEIRO TRATADO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	2.3 TIPO DO TRATAMENTO 1. ☐ COMP. 2. ☐ POMADA 3. ☐ INJEÇÃO	2.4 TRATAMENTO CONCOMITANTE C/ PARCERIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
EXAME GINECOLÓGICO		
ACHADOS EM GENITÁLIA EXTERNA 1. ☐ VESÍCULA 2. ☐ VERRUGA 3. ☐ ÚLCERA 4. ☐ BOLHA 5. ☐ PETÉQUIAS 6. ☐ ODOR 7. OUTRO (Descrever)		
ACHADOS EM GENITÁLIA INTERNA 1. ☐ MUCOPUS ENDOCERVICAL 2. ☐ CORRIMENTO VAGINAL 3. ☐ COLO FRIÁVEL 4. ☐ MASSA ANORMAL DE TECIDO NO COLO 5. OUTROS (Descrever):		
CONDUTA		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> __/__/__ DATA </div> <div> _____ ASSINATURA E CARIMBO </div> </div>		