JOÃO GUILHERME PINTO VINAGRE

**Infecção por *Chlamydia trachomatis*, obstrução tubária e
polimorfismo genético no códon 54 do gene que codifica a
lectina ligadora de manose (MBL) em mulheres brasileiras**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Iara Moreno Linhares

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vinagre, João Guilherme Pinto
Infecção por Chlamydia trachomatis, obstrução
tubária e polimorfismo genético no códon 54 do gene
que codifica a lectina ligadora de manose (MBL) em
mulheres brasileiras / João Guilherme Pinto
Vinagre. -- São Paulo, 2018.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Iara Moreno Linhares.

Descritores: 1.Chlamydia trachomatis
2.Polimorfismo genético 3.Lectinas de ligação a
manose 4.Doenças das tubas uterinas 5.Imunidade
inata 6.Doença inflamatória pélvica

USP/FM/DBD-465/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A minha família, aos meus pais (**João e Luzia**), pela imensa dedicação e comprometimento com minha educação. Pelo exemplo de médicos e professores a serem seguidos. Pela confiança sempre a mim depositada e amor incondicional que me assegura remar cada vez mais longe. Ao meu irmão (**Túlio Henrique**), pela parceria e companheirismo.

A minha esposa **Jullianna**, que nunca hesitou em apostar em nosso amor de quatro anos a distância, que sempre apoiou cada novo projeto na minha carreira, proporcionando condições físicas e emocionais para conquistar nossas metas. Obrigado pelo carinho, e compreensão por tantos momentos de ausência.

Ao meu filho, **João Bernardo**. Mesmo com poucos meses a este momento, teve papel crucial na preparação dessa tese. A cada intervalo, seu sorriso e olhar me carregavam de energia para continuar estudando e escrevendo.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Edmund Chada Baracat, meu profundo agradecimento pela oportunidade e confiança de participar da pós-graduação da Faculdade de Medicina da USP, pela qual tenho tanta admiração.

À Professora Doutora Iara Moreno Linhares, pela paciência, ajuda e compreensão por orientar um aluno à distância. Por ter se feito exemplo de pesquisadora em cada fase deste trabalho, e por nunca hesitar em compartilhar sua experiência em prol do engrandecimento de cada aluno da sua disciplina. Meu muito obrigado pela confiança, e por ter amadurecido em mim um lado pesquisador.

Ao Professor Dr. Steven Witkin, pela inestimável colaboração na elaboração do projeto e permitindo que todos os ensaios laboratoriais fossem realizados no laboratório da *Division of Immunology and Infectious Diseases da Weill Cornell Medicine*, sob sua direção.

Aos Professores Doutores José Maria Soares Júnior, Lana Maria de Aguiar e Maurício Simões Abrão, pelas importantes contribuições durante o exame de qualificação.

Ao Professor Doutor Sérgio Conti Ribeiro, pela oportunidade de participar do ambulatório de videolaparoscopia do HCFMUSP e pelas diversas sugestões para o projeto do trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo César Serafini, pela colaboração em oferecer a casuística do Centro de Reprodução Humana para a construção deste trabalho.

À Professora Doutora Kátia Cândido Carvalho, pelo suporte nas atividades de laboratório desse projeto e por toda disponibilidade em momentos cruciais do mesmo.

À colega Dra Elko Fukazawa, pelo apoio em diversos momentos da pós-graduação.

À estudante Carla Calviente Ortolani, pela ajuda na laboriosa tarefa da construção de tabelas e na catalogação dos questionários aplicados.

Ao colega Thiago Hideki, pelo importante trabalho realizado no LIM 58.

À Srta. Cláudia Vieira, por toda ajuda prestada no ambulatório e pela importante contribuição na formatação da dissertação.

Às pacientes, colaboradoras fundamentais, mesmo no anonimato, para a realização desse estudo e contribuindo para o desenvolvimento da ciência.

À colega Fátima Moreno Pires, minha homenagem a quem deu os primeiros passos para que este projeto acontecesse. Tão admirada e querida pelos colegas e amigos, deixou saudade entre todos. Meu profundo agradecimento.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de / Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
1.1	<i>Chlamydia trachomatis</i>	2
1.2	Considerações gerais sobre o sistema imune	8
1.3	Lectina ligadora de manose (MBL)	16
2	Objetivo.....	22
3	Métodos	24
3.1	Desenho do estudo	25
3.2	Cálculo amostral	25
3.3	Local de realização	25
3.4	Pacientes	26
3.5	Método de estudo	27
3.5.1	Determinação do polimorfismo genético no códon 54 do gene que codifica a lectina ligadora de manose (MBL).....	29
3.6	Análise estatística	31
4	Resultados	33
4.1	Características demográficas e história clínica	34
4.2	Distribuição dos genótipos da MBL e condição de permeabilidade das tubas uterinas.....	40
4.3	Presença de anticorpos IgG antichlamydia nos grupos estudados....	42
4.4	Comparação entre o polimorfismo do gene que codifica a MBL e sorologia para a <i>Chlamydia trachomatis</i> ente os grupos estudo e controle.....	43
5	Discussão	44
6	Conclusão.....	53
7	Anexos	55
8	Referências.....	64

LISTAS

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AER	Aborto espontâneo de repetição
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Graus Celsius
CAPPesp	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
C4	Fração C4 do complemento
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EB	<i>Elementary body</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papiloma vírus humano
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
KDa	kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Linfogranuloma venéreo
MASP	Protease associada à serina
MBL	Lectina ligadora de manose
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
n	Número de pacientes
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanometro

OR	<i>Odds ratios</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	p valor
PAMPS	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PKC	Proteína quinase C
PRM	Moléculas solúveis de receptores de patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RB	<i>Reticulate body</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SLPI	Inibidor da protease secretório de leucócito
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TH	<i>T helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

Tabelas

Tabela 1	Distribuição das principais características demográficas do grupo estudo (mulheres com obstrução tubária n=75) e do grupo controle (mulheres com tubas pérvias n=75).	35
Tabela 2	Distribuição das características demográficas e de antecedentes sexuais dos grupos estudo e controle e o <i>status</i> de infec���� prévia pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
Tabela 3	Comparação entre sintomas referidos pelo grupo estudo (mulheres com obstrução tubária n=75) e pelo grupo controle (mulheres com tubas pérvias n=75)	37
Tabela 4	Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas em mulheres com e sem obstrução tubária	38
Tabela 5	Comparação entre sintomas mais comuns referidos por pacientes com resultado positivo ou negativo da IgG antichlamydia	39
Tabela 6	Associa���� entre o polimorfismo no c����n 54 do gene que codifica a lectina ligadora de manose (MBL) e condi���� de permeabilidade das tubas uterinas	41
Tabela 7	Associa���� entre IgG antichlamydia e condi���� de permeabilidade das tubas uterinas.	42
Tabela 8	Associa���� entre o polimorfismo do gene que codifica a MBL e a sorologia para <i>Chlamydia</i> na oclus���� da tuba uterina.	43

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma do estudo	29
---------------------------------------	----

RESUMO

Vinagre JGP. *Infecção por Chlamydia trachomatis, obstrução tubária e polimorfismo genético no códon 54 do gene que codifica a lectina ligadora de manose (MBL) em mulheres brasileiras* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: *Chlamydia trachomatis* (CT) é causa da infecção sexualmente transmitida de origem bacteriana mais comum. Na mulher, a infecção genital pela CT pode causar cervicite, uretrite, endometrite, salpingite. Infecções persistentes ou recorrentes provavelmente representam um importante fator de risco para o desenvolvimento de sequelas associadas, como dor pélvica crônica, gravidez ectópica e infertilidade por fator tubário. A lectina ligadora de manose (MBL), componente do sistema imune inato, tem importante papel na defesa antimicrobiana, reconhecendo vírus, fungos e patógenos bacterianos. O gene que codifica para a MBL é polimórfico, e a substituição de um único nucleotídeo resulta na produção de uma proteína instável, que é rapidamente degradada. **Objetivo:** Avaliar se mulheres brasileiras portadoras de um polimorfismo do gene da MBL apresentam diferentes susceptibilidades para a ocorrência de obstrução tubária, na presença ou ausência de uma infecção prévia por *Chlamydia trachomatis*. **Métodos:** Em estudo caso-controle, foram avaliadas 75 pacientes com obstrução tubária e 75 pacientes com tubas pérvias, atendidas na Divisão de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Anticorpos IgG anti-CT foram mensurados através de um ensaio de imunoabsorção enzimática para investigar uma infecção prévia pela CT. Para o polimorfismo, realizou-se coleta de células bucais e o DNA extraído foi analisado através de reação em cadeia da polimerase (PCR), digestão de endonuclease e gel de eletroforese, utilizando pares de *primers* específicos para a região polimórfica. Todo material foi mantido a -80°C e enviado em gelo seco para a *Division of Immunology and Infectious Diseases* da *Weill Cornell Medicine* em Nova York. Associações entre genótipos de MBL ou alelos e permeabilidade tubária foram analisadas pelo teste de qui-quadrado de *Pearson* com ou sem correção de *Yates*. **Resultados:** Não houve diferença na detecção de anticorpos da CT entre os grupos. Mulheres com tubas obstruídas tiveram uma prevalência maior do genótipo AB (36%) versus (16%), resultado estatisticamente significativo ($p<0,01$). De maneira semelhante, a distribuição do alelo A e do alelo variante B também apresentaram diferenças significantes entre os grupos ($p<0,01$). **Conclusão:** Os achados sugerem, que embora a exposição à *Chlamydia trachomatis* tenha sido semelhante em ambos os grupos, a presença do alelo variante B do gene que codifica para a MBL aumenta o risco de desenvolvimento da obstrução tubária, subsequente à infecção pela CT ou outros agentes infecciosos. Nas mulheres brasileiras avaliadas a presença de tal polimorfismo genético aumentou a probabilidade de obstrução tubária em consequência de uma infecção do trato genital.

Descritores: *Chlamydia trachomatis*; polimorfismo genético; lectinas de ligação a manose; doenças das tubas uterinas; imunidade inata; doença inflamatória pélvica.

ABSTRACT

Vinagre JGP. *Chlamydia trachomatis* infection, tubal obstruction and mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism in Brazilian woman [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: *Chlamydia trachomatis* (CT) is the cause of the most common bacterial sexually transmitted infection. In women, genital CT infection may cause cervicitis, urethritis, endometritis, salpingitis. Persistent or recurrent infections probably represent an important risk factor for the development of associated sequelae, such as chronic pelvic pain, ectopic pregnancy and tubal factor infertility. Mannose-binding lectin (MBL), a component of the innate immune system, has an important role in antimicrobial defense, recognizing viral, bacterial and fungal pathogens. The gene coding for MBL is polymorphic and a single nucleotide substitution results in production of an unstable protein, that is rapidly degraded. **Objective:** To evaluate whether Brazilian women with a polymorphism in the MBL gene present different susceptibilities to the occurrence of fallopian tube damage, in the presence or absence of a previous infection by CT. **Method:** In a case-control study, 75 patients with tubal obstruction and 75 patients with patent tubes were studied, all seen at the Gynecology Division of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo (HCFMUSP). IgG anti-CT antibodies were measured by enzyme-linked immunoassay to investigate a previous CT infection. For the polymorphism analysis, buccal cells were collected and the extracted DNA was analyzed by polymerase chain reaction (PCR), endonuclease digestion and gel electrophoresis using primer pairs specific for the polymorphic region. All material was maintained at -80 ° C and sent on dry ice to the Division of Immunology and Infectious Diseases at Weill Cornell Medicine in New York. Associations between MBL genotypes or alleles and tubal permeability were analyzed by the Pearson chi-square test with or without Yates correction. **Results:** There was no difference in CT antibody detection between the two groups. Women with obstructed tubes had a higher prevalence of being positive for the heterogenous genotype AB (36%) versus (16%) ($p < 0.01$). Similarly, the distribution of the normal A allele and variant B allele were also significant different between the two groups ($p < 0.01$). **Conclusion:** The findings suggest that while exposure to CT was similar in both groups of women the presence of the variant MBL B allele increases the risk for development of tubal obstruction, subsequent to a CT or other infection. In the Brazilian women evaluated possession of this genetic polymorphism increased the likelihood that blocked fallopian tubes will be a consequence of a genital tract infection.

Descriptors: *Chlamydia trachomatis*; polymorphism, genetic; mannose-binding lectin; fallopian tube diseases; immunity, innate; pelvic inflammatory disease.

1 INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis (CT) é um bacilo Gram-negativo de vida intracelular obrigatória, que apresenta predileção por infectar células epiteliais do aparelho ocular e do trato reprodutivo ¹. São conhecidos quinze sorotipos, que determinam as diferentes apresentações clínicas. A, B, Ba, C estão relacionados ao tracoma; L1, L2, L2a, L3, por sua vez, estão associados ao linfogranuloma venéreo; enquanto que os sorotipos D, E, F, G, H, I, J e K causam as infecções do trato urogenital ².

Nos Estados Unidos, a *Chlamydia trachomatis* é a causa da doença infecciosa bacteriana mais notificada representando a moléstia sexualmente transmitida mais comum desde 1994. Em 2016 foram reportados ao “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) um total de 1.598.354 casos de infecção por essa bactéria em todos os 50 estados e no distrito de Columbia, refletindo uma taxa de incidência de 497,3 casos por 100.000 pessoas. Este resultado é o maior registro de notificação de uma doença na história do CDC no curso de um ano. A taxa de notificação da infecção pela CT vem aumentando desde o ano 2000, quando a notificação se tornou compulsória em todos os estados americanos. Entre 2000 e 2011, a taxa elevou-se de 251,4 para 453,4; e de 475,0 para 497,3 casos por 100.000 pessoas entre 2015 e 2016 ³. A prevalência é consistentemente mais

elevada entre mulheres jovens (15 a 24 anos de idade). O CDC monitora a prevalência da infecção pela *Chlamydia* através do “*National Health and Nutrition Examination Survey*” (NHANES). Os dados mais recentes são de 2007-2012, e a estimativa das pessoas entre 14-39 anos com a *Chlamydia* foi de 1,7% (IC 95%: 1,4-2,0%). Entre mulheres sexualmente ativas de 14-24 anos de idade, alvo da população rastreada nos Estados Unidos, a prevalência geral foi 4,7%, sendo 13,5% entre mulheres negras não-hispânicas ⁴.

Dados nacionalmente representativos de prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* são limitados em países com poucos recursos, inclusive no Brasil, onde a infecção não é de notificação compulsória e os estudos adotam técnicas variadas para a identificação da CT⁵. Em estudo realizado em Vitória (ES), amostras de urina de 464 adolescentes (15 a 19 anos) foram estudadas e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para detectar a CT. A prevalência da bactéria foi de 8,9% ⁶. Em outro estudo, realizado em Belo Horizonte (MG), amostras colhidas da ectocérvice e endocérvice de 224 pacientes foram também avaliadas por PCR; a prevalência na cérvix foi de 6,3% para CT ⁷. Na região metropolitana de São Paulo foi realizado estudo em 781 mulheres com idades entre 18 e 40 anos provenientes da atenção primária à saúde. A pesquisa de CT por PCR usando a autocoleta de material vaginal demonstrou prevalência de 8,4% ⁸. No município de Goiânia, um estudo com 296 adolescentes do sexo feminino revelou uma prevalência geral de 19,6% de pacientes infectadas por essa bactéria, sendo que cerca de 70% delas eram assintomáticas ⁹.

Como as infecções pela *Chlamydia* geralmente são silenciosas, a incidência pode aumentar a medida que mais pessoas sejam rastreadas, melhores sejam as técnicas de diagnóstico e que se torne um hábito a notificação da infecção ².

Alguns fatores estão associados a maior risco de infecção por *Chlamydia trachomatis*. Dentre estes, ressaltam-se idade inferior a 25 anos, o advento de um novo parceiro sexual nos últimos três meses, antecedente de infecção por essa bactéria e o uso inconsistente de preservativo ¹⁰. No último relatório do “*Centers for Disease Control and Prevention*” (CDC), diferenças raciais ainda existem ¹¹, tendo sido encontrado uma prevalência de 14% em afro-americanas, cerca de seis vezes maior do que na população caucasiana; assim como ainda persiste a diferença entre regiões dos Estados Unidos, sendo o Estado do Alaska o que tem a maior prevalência, com a população nativa a mais atingida ³.

Na mulher, a infecção genital pela *Chlamydia trachomatis* pode causar cervicite, uretrite, endometrite e salpingite. Trata-se de uma infecção ascendente, portanto, o primeiro alvo a ser atingido é o colo do útero e eventualmente a uretra. Quando sintomática, a cervicite pode cursar com corrimento mucopurulento, não pruriginoso, podendo ser visualizado, ao exame especular, acometendo especialmente o óstio externo da cérvix ¹². Este se torna friável, motivo de sangramento por uma simples coleta de citológico, pela passagem do espéculo ou após relação sexual. A presença de ectopia cervical, epitélio colunar sobre o estratificado da superfície externa do colo, tem sido associada a um risco aumentado de contrair a CT,

assim como o subsequente risco de desenvolver neoplasia cervical, pois a coinfeção da bactéria com o papiloma vírus humano (HPV) de alto risco favorece a persistência do mesmo ^{5, 13}.

Quando a uretra é atingida, a queixa principal costuma ser disúria acompanhada ou não por polaciúria. Contudo, apenas um quarto das mulheres com infecção cervical por *Chlamydia* apresenta acometimento da uretra. Urocultura e coloração por Gram dificilmente identificam a bactéria, enquanto que a urina tipo 1 pode revelar alguns piócitos. Essa combinação laboratorial em paciente jovens e com comportamento sexual de risco é sugestiva de uretrite por CT ⁷.

Infecções persistentes ou recorrentes provavelmente representam um importante fator de risco para o desenvolvimento de sequelas associadas a essa bactéria ¹⁴, como a doença inflamatória pélvica (DIP), dor pélvica crônica, gravidez ectópica e infertilidade por fator tubário ¹⁰. Nesse caso, história de dor abdominal severa, associada à dispareunia, metrorragia, acompanhados ou não de febre são sintomas que podem ser observados na DIP ⁷. Algumas vezes, dor no hipocôndrio direito ou dor pleurítica são sintomas da peri-hepatite (síndrome *Fitz-Hugh-Curtis*), inflamação na cápsula do fígado, que normalmente não causa elevação das enzimas hepáticas ¹⁵. Na laparoscopia, identificam-se traves fibróticas entre o diafragma e o fígado, sinal conhecido como “cordas de violino” ¹².

Os sorotipos L1, L2 e L3 da CT, responsáveis por causar o linfogranuloma venéreo (LV), apresentam um comportamento diferente dos sorotipos A-K. Os primeiros infectam predominantemente monócitos e

macrófagos, passam pela superfície epitelial até alcançar os linfonodos regionais, podendo causar infecção disseminada. O primeiro estágio do LV corresponde a uma pequena pápula no local da inoculação, que pode ulcerar. É autolimitada e indolor, passando muitas vezes despercebida. Algumas semanas após surge uma dolorosa linfadenopatia da região inguinal e/ou femoral, normalmente unilateral. O ânus e o reto também podem ser afetados nesse segundo estágio e, quando isso acontece, os pacientes podem ter sangramento e sintomas sistêmicos (febre, calafrio e perda de peso). Caso a infecção não seja tratada, o processo pode cronicar (terceiro estágio) atingindo vasos e sistema linfático, e a extensa fibrose formada pode levar a uma condição grave e desfigurante: a elefantíase genital ^{16, 17}.

Em gestantes, a infecção pela CT pode causar rotura prematura de membranas ovulares, prematuridade, morte perinatal e baixo peso ¹⁸, além da gravidez ectópica que é uma das principais causas de morte materna no primeiro trimestre ^{2,19}. Porém, alguns desses dados são controversos ²⁰. Uma coorte prospectiva realizada com 3913 gestantes rastreadas para *Chlamydia trachomatis* identificou correlação significativa entre as mulheres infectadas por essa bactéria e desfecho de prematuridade de 0,6% antes de 32 semanas e de 1,6% antes de 35 semanas. Entretanto, abortamento, natimortalidade, morte neonatal, baixo peso ao nascimento não foram associações significativas ²¹. Quando o recém-nascido é acometido, conjuntivite e pneumonia são as manifestações clínicas mais estudadas ²². Em estudo de 5.531 gestantes, 262 (4,7%) apresentara cultura cervical

positiva para CT; após o nascimento 131 crianças foram acompanhadas por 5 anos, 23 delas (18%) tiveram conjuntivite e 21 (16%), pneumonia ²³.

A *Chlamydia trachomatis* tem ciclo de desenvolvimento bifásico, apresentando duas formas bem distintas e especializadas: os corpos elementares (EB) e os corpos reticulares (RB). A bactéria não possui cadeia de enzimas de transporte de elétrons, necessitando adquirir nutrientes e adenosina trifosfato (ATP) da célula hospedeira para promover seu metabolismo e replicação ¹. A forma infecciosa, que corresponde ao EB, é metabolicamente inativa, tem estrutura semelhante a um esporo e diâmetro de aproximadamente 350 nm. O EB se liga a células epiteliais susceptíveis e invade essa barreira por múltiplos mecanismos, ainda pouco elucidados. Uma vez dentro da célula, o EB é cercado por membranas endossomais, que migram para a região distal do complexo de Golgi. Formam-se vacúolos, que representam nichos intracelulares imunes à destruição enzimática pelos lisossomos. Nessas inclusões, o EB se converte na forma maior e metabolicamente ativa, o RB. Usando metabólitos do hospedeiro, este se replica por divisão binária e, em 48 a 72 horas, os endossomos estão repletos de RB. Antes de serem liberados para o meio extracelular, os RB novamente se convertem na forma infectante. São, então, liberados das células por três mecanismos distintos: citólise, exocitose ou extrusão de todo o vacúolo. Os dois últimos mecanismos podem explicar a frequências das infecções assintomáticas, já que deixam a célula do hospedeiro intacta ^{22, 24}.

1.2 Considerações gerais sobre o sistema imune

A palavra imunidade tem origem latina e deriva da palavra *imunitas*, que se referia ao “foro privilegiado” que era oferecido aos senadores romanos durante seus mandatos. Historicamente, imunidade significa proteção contra doenças infecciosas. Portanto, a imunologia é o estudo das defesas do organismo contra a infecção ²⁵.

Didaticamente, o sistema imune é dividido em dois braços, imunidade natural ou inata e imunidade adquirida ou adaptativa ²⁶.

A imunidade inata existe desde o nascimento e constitui a primeira linha de defesa contra as infecções. Filogeneticamente é a mais antiga do sistema imune. Alguns componentes dessa linha de defesa são marcadamente similares aos componentes da imunidade de plantas e insetos. A imunidade inata consiste em mecanismos já prontos no organismo mesmo antes da infecção, sendo capaz de gerar rápida resposta ao agente invasor, prevenindo, controlando ou eliminando a infecção por diversos patógenos ²⁷. Cerca de noventa por cento das agressões microbianas são controladas pelo sistema imune inato, através de um padrão de resposta similar frente a todas as substâncias estranhas. Mesmo após exposição repetida ao mesmo antígeno, não há modificação na potência da resposta, já que a imunidade inata não produz memória. Sua resposta é baseada na defesa inflamatória, na defesa antiviral, além das barreiras físicas e químicas das superfícies epiteliais ²⁸.

As superfícies epiteliais do organismo proporcionam uma barreira física entre o meio interno e o ambiente externo. Faz parte do inventário de defesa dessas interfaces a presença de queratina na epiderme; o muco produzido pelas células respiratórias, gastrointestinais e urogenitais; além de peptídeos que possuem propriedades antimicrobianas produzidos pelas células epiteliais: as defensinas e as catelicidinas ²⁷. A maioria das superfícies epiteliais é colonizada por bactérias comensais, que competem com os microrganismos patogênicos pelos nutrientes e pelo sítio de adesão nas células epiteliais. A microbiota vaginal representa um dos mais importantes mecanismos de defesa do trato genital, sendo geralmente dominada por *Lactobacilli* ²⁹. A produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácido láctico por estes microrganismos é essencial para a manutenção do ecossistema saudável, e o pH ácido resultante previne a proliferação excessiva de microrganismos potencialmente patogênicos. A sobrevivência das bactérias comensais no organismo é regulada pelo balanço entre crescimento bacteriano e eliminação pelos mecanismos da imunidade inata. Falhas nesse mecanismo, como causada pela deficiência hereditária de proteínas da resposta inata, pode possibilitar que bactérias não-patogênicas proliferem excessivamente e causem doenças ³⁰.

Os fatores de imunidade inata que atuam na vagina, além da microbiota, são representados por fatores solúveis com potente atividade antimicrobiana não específica, tais como a lectina ligadora de manose (MBL), componentes do complemento, defensinas, inibidor da protease

secretório de leucócito (SLPI), óxido nítrico, componentes associados a membranas celulares (*toll-like receptor* [TLR]) e células fagocitárias³¹.

Tipicamente, os microrganismos carregam padrões moleculares repetidos na sua superfície. São exemplos os flagelos bacterianos, formados por subunidades repetidas de proteínas e o RNA de dupla-fita, presente em quase todos os vírus³². Essas estruturas repetidas são conhecidas como padrões moleculares associados aos patógeno (PAMPS, *pathogen-associated molecular pattern*)³³. Células danificadas ou mortas também carregam padrões moleculares, conhecidos como DAMPs (padrões moleculares associados ao dano). Existem receptores que reconhecem os PAMPS, que são denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e estão presentes nos fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células dendríticas e células epiteliais. Os PAMPs ainda são reconhecidos por proteínas presentes no sangue e nos fluidos extracelulares³⁴. Quando os PRRs são ativados, vias de transdução de sinal são ativadas e as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias são iniciadas²⁵.

A família de *Toll like receptors* é expressa na membrana plasmática e em organelas lisossomais. Os diferentes membros da família têm diferentes especificidades e funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR). Já foram identificados onze tipos de TLR no ser humano. Por exemplo, o TLR4 reconhece como PAMPS os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram negativas; TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 reconhecem ácidos lipocóicos e lipoproteínas de bactérias Gram positivas, respectivamente; TLR3 reconhece cadeias duplas de RNA viral; TLR5 reconhece flagelina. Os

TLRs endossomais são direcionados principalmente para ácidos nucleicos microbianos ³⁵.

As células do sistema imune inato servem como sentinelas para detectar microrganismos e células danificadas nos tecidos, podendo distinguir o próprio do não próprio. Os macrófagos e neutrófilos são células fagocíticas e compõem a primeira linha de defesa contra microrganismos que rompem as barreiras epiteliais. Outro importante representante da imunidade inata é a célula dendrítica, rica em TLRs e PRRs. São capazes de captar os antígenos proteicos microbianos, transportá-los para os linfonodos e apresentá-los para as células T imaturas, disparando a imunidade adquirida ²⁵. Além dos tipos celulares citados, as células *natural killer* (NK) tem papel crucial nesse braço da imunidade. São derivadas da medula óssea com morfologia linfocítica. Maiores que os linfócitos B e T, possuem grânulos citoplasmáticos distintos e recebem esse nome por ter como principal função a morte de células infectadas por patógenos intracelulares, particularmente por herpes vírus e pelo parasita *Leishmania*. Adicionalmente, são capazes de induzir morte de células tumorais, mesmo na ausência de imunização específica ³⁶. Ativadas pela interleucina 12 (IL-12) e pela interleucina 15 (IL-15), liberam os grânulos citoplasmáticos como perforinas e granzimas, iniciando uma sequência de eventos que causam a morte da célula-alvo por apoptose. Outro mecanismo da célula NK é ativar macrófagos, através da produção do interferon gama (IFN- γ) ³⁷.

A imunidade adaptativa, também denominada adquirida, depende de um contato inicial (ao contrário da inata, que existe desde o nascimento) e

se caracteriza pela habilidade de distinguir partes específicas dos antígenos (epítomos), o que lhe confere especificidade. Esta habilidade é explicada através dos clones de linfócitos, presentes em indivíduos não imunizados, que são capazes de reconhecer e responder a antígenos estranhos. Uma vez exposto ao antígeno, ocorre um incremento vasto e rápido do número de células com o mesmo receptor (clone), caracterizando a expansão clonal ²⁵. Caso ocorra uma segunda exposição ao mesmo antígeno, o sistema imune adaptativo é capaz de produzir uma resposta mais rápida, mais potente e ainda mais específica, graças à capacidade de “memória”. Existe a memória sorológica (anticorpos circulantes no sangue) e existe a memória reativa, celular (células B de memória que circulam pelo sangue e podem ser estimuladas a produzir anticorpos, caso encontrem o patógeno específico). Entretanto, estudos recentes têm sugerido que a habilidade da memória não seja exclusividade da imunidade adquirida. Por exemplo, células NK e monócitos, que são elementos do sistema imune inato, ficariam em um estado otimizado persistente após exposição a determinados agentes infecciosos. Essa condição tem sido chamada de “imunidade treinada” ³⁸. Finalmente, a imunidade adaptativa tem a habilidade de reconhecer o que é próprio, e não gerar uma resposta aos próprios antígenos, característica essa conhecida como tolerância. O desequilíbrio dessa propriedade pode resultar em doenças autoimunes ³⁹.

Há dois tipos de resposta imune adquirida, designadas como humoral e celular. A primeira é mediada por anticorpos (imunoglobulinas) produzidos pelas células B. Estas carregam receptor exclusivo de membrana, que é

antígeno-específico. A imunidade humoral normalmente se inicia pela produção anticorpos IgM, seguida pela de IgG, que apresenta afinidade crescente, devido à seleção de clones superiores em avidéz ⁴⁰. Anticorpos tem capacidade de reconhecer estruturas tridimensionais, habilitando-os a interagir e neutralizar patógenos do meio extracelular. Cada molécula de imunoglobulina tem dois terminais funcionais: porção Fab, que se liga a antígenos e a porção FC, responsável pelas funções efectoras ⁴¹.

A imunidade celular, por sua vez, é regida especialmente pelos linfócitos T, os quais possuem proteínas de superfície de membrana, designadas como *cluster of differentiation* (CD). As mais comuns são o CD4 e o CD8, embora existam vários outros como os que caracterizam as células NK: CD3, CD56 e CD16. As células T citotóxicas (CD8), após sua maturação no timo, lisam as células que carregam antígenos estranhos, como as infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares ⁴². As células CD4, por sua vez, deixam o timo ainda imaturas e vão se diferenciar em Th1, Th2 e Th17, dependendo da natureza das citocinas presentes no sítio da ativação. Interleucina 12 (IL-12) produzida pelas macrófagos e linfócitos NK induz a diferenciação em direção a Th1; interleucina 4 (IL-4) produzida pelos basófilos e mastócitos direciona a diferenciação para Th2. TGF- β e interleucina 6 (IL-6) induz para a Th-17 ³⁹.

As células da linhagem Th1 podem combater a infecção de duas maneiras: 1. Auxiliando macrófagos infectados a fundir seus lisossomas às vesículas que contêm bactérias, contribuindo para controlar infecções bacterianas intracelulares; 2. Estimulando a produção de anticorpos pela

interação com os linfócitos B. As células Th2 são dedicadas à ativação das células B virgens para a produção de anticorpos, sendo mais efetiva contra helmintos e bactérias extracelulares. Células Th-17 são induzidas precocemente na imunidade adaptativa como resposta a bactérias extracelulares e ajudam a recrutar neutrófilos para eliminar esses patógenos ⁴³.

Células Th1 são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição T-box (T-bet) e pela produção do IL-2, IFN- γ e linfotóxina. As Th2 são caracterizadas pela transcrição do fator GATA-3 e produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF. Células Th-17, por sua vez, expressam o fator de transcrição RORC2 e produzem as interleucinas IL-6 e IL-17. Linfócitos Th1 e Th2 frequentemente participam da resposta imune conjuntamente. Contudo, após prolongado processo de imunização, a resposta imune se torna dominante Th1 ou Th2. Por vezes, tais respostas podem ser consideradas antagônicas, já que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2 e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, permitindo uma resposta imunológica balanceada ^{31, 39, 44}.

As células T detectam peptídeos derivados de antígenos, após os mesmos serem degradados dentro das células, e esses fragmentos serem expostos por proteínas do hospedeiro na superfície celular, chamadas complexo maior de histocompatibilidade (MHC). As moléculas do MHC de classe I coletam peptídeos sintetizados no citosol e são capazes de apresentar os fragmentos de proteínas virais na superfície celular. Dessa forma, as células T citotóxicas portadoras do CD8 reconhecem as células

com MHC de classe I ligadas aos peptídeos virais e as destroem. As moléculas do MHC de classe II, por seu lado, se ligam a peptídeos derivados das proteínas nas vesículas intracelulares, exibindo patógenos internalizados por células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas. Sendo assim, as moléculas do MHC de classe II são reconhecidas por células T CD4, ativando a resposta imune adquirida. Diferentemente do MHC de classe II, as moléculas de MHC de classe I estão na superfície de qualquer célula, para que quando esta seja infectada por um vírus, seja reconhecida e eliminada do organismo pelo linfócito T CD8^{26, 44}.

A imunidade inata e adaptativa, embora sejam frequentemente descritas como braços distintos da resposta do hospedeiro, atuam sinergicamente. A primeira frente de combate é regida pelos mecanismos prontos da resposta inata; enquanto a defesa adaptativa, mais ampla e específica, se forma nos bastidores. A primeira ativa a segunda, a segunda retroalimenta a primeira³⁹. A evolução dos patógenos, modificando seus padrões moleculares de membrana, por vezes, permite a evasão dos mecanismos da imunidade inata. Surge então o elemento-chave da imunidade adquirida: o vasto repertório de receptores específicos dos linfócitos B e T, gerados pela recombinação somática dos segmentos dos genes que os determinam⁴⁴.

1.3 Lectina ligadora de manose (MBL)

Como anteriormente exposto, um número diferente de moléculas do sistema imune tem a função de reconhecer antígenos através de estruturas dispostas em suas superfícies, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Tal reconhecimento pode estar associado a receptores celulares (receptor reconhecedor de patógeno - PRR) ou a moléculas solúveis de receptores de patógenos (PRM). Este grupo inclui as colectinas, família de moléculas proteicas que desempenham importante papel no sistema imune inato, entre as quais a lectina ligadora de manose (MBL) ⁴⁵. No sangue, MBL fica associada a MBL-protease associada à serina (MASP), enzima necessária para ativação do fator complemento C4 ^{34, 46}.

A MBL é sintetizada primariamente no fígado, porém a produção local na vagina ainda permanece incerta ²⁹. Embora MBL predominantemente circule como proteína sérica, ela também foi detectada em outros sítios, como no fluido auricular; sinovial de articulações inflamadas; amniótico de gestações de 26 semanas; e de secreção da nasofaringe. Além da forma secretada, reservatórios intracelulares da MBL foram descritos em vesículas do retículo endoplasmático; e tem sido sugerido que ela atue no controle de qualidade da síntese de proteínas ⁴⁷.

As colectinas são uma família de proteínas triméricas e hexaméricas, cada subunidade contendo uma cauda do tipo colágeno conectada à lectina (tipo C), dependente de cálcio ²⁹. No homem, há duas outras grandes

colectinas: proteína SP-A e proteína SP-D, que são surfactantes pulmonares. Os três tipos de colectinas são macromoléculas, sendo que a MBL e a SP-A têm estrutura de *bouquet*, semelhante ao C1q. Entretanto, no caso da MBL, várias estruturas oligoméricas entre dímeros a hexâmetros foram reportadas. Esses oligômeros são à base de três cadeias idênticas de peptídeos de 32 kDa. Cada cadeia é caracterizada por um domínio de lectina, uma região cervical hidrofóbica, uma região de colágeno e uma região N-terminal-cisteína ⁴⁷. Cada região de colágeno das três cadeias interage para dar a forma clássica de hélix triplo. Cada domínio se liga a um íon de cálcio que é capaz de coordenar pontes de grupos de hidroxila dos açúcares apropriados, como a N-acetil-d-glucosamina, manose, N-acetyl-manosamina, fucose e glicose. Embora a força das ligações de cada ponte de lectina com a molécula de açúcar não seja considerada forte, o fato da MBL apresentar múltiplos locais de ligação a torna uma molécula de grande capacidade funcional ⁴⁸.

Como importante componente do sistema imune inato, existem evidências de que a MBL tem pelo menos quatro funções distintas:

1. Ativação do complemento;
2. Promoção da fagocitose por opsonização (independente do complemento);
3. Modulação da inflamação;
4. Promoção da apoptose.

A ativação do complemento mediada pela MBL, sua função mais estudada, representa uma terceira via, distinta da via clássica e da

alternativa. O complexo MBL-MASP-2 se torna ativado quando se liga a superfície de micróbios que expõem os arranjos de açúcares apropriados. MASP-2, então, expressa atividade enzimática idêntica a C1 estearase, dando início a cascata de ativação do complemento. Esta importante atividade funcional explica o porquê da deficiência da MBL foi primeiro identificada em associação com uma disfunção de opsonização em crianças com infecções de repetição ⁴⁸.

Os genes que codificam para a MBL são polimórficos e se encontram localizados em um cluster no cromossomo 10 (q21–24). Polimorfismos genéticos são pequenas mudanças na sequência do DNA e geralmente envolvem a troca de um único par de base nitrogenada ou a repetição de bases. O polimorfismo pode acontecer na região promotora do gene (parte do DNA que não é transcrito), ou na parte codificante ²⁹. O gene MBL-2 inclui quatro éxons (sequência codificante), interrompido por três íntrons (região não codificante) de 600, 1350 e 800 pares de base ⁴⁹. Sabe-se de alterações pontuais no éxon 1 levam a deficiência da proteína MBL. O códon 54 é o lugar mais comum do polimorfismo da MBL em populações brancas. Tal polimorfismo consiste na troca do nucleotídeo adenina pela guanina, resultando na proteína polimérica MBL, instável, que é rapidamente degradada ⁵⁰. Já foram estudados outros polimorfismos: no códon 57, que está presente com maior frequência na raça negra; e no códon 52, mais raro e representado apenas em 5% de ambas as populações ²⁸. Essas alterações são frequentemente referidas como variantes B, C e D, respectivamente, sendo a variante A indicativa da forma selvagem ⁴⁸.

Adicionalmente, dois comuns polimorfismos (H/L e Y/X), identificados na região promotora ascendente, também determinam níveis séricos da MBL, regulando a expressão da proteína ^{47, 51}. Como consequência dessas alterações, a montagem e a estabilidade da proteína MBL final é marcadamente reduzida. Níveis séricos normais em indivíduos homozigotos para a forma selvagem (alelo guanina) se encontram entre 1,2-1,7 mcg/ml, 0,3 mcg/ml em indivíduos heterozigotos, e 10 ng/ml em indivíduos homozigotos para o alelo variante (adenina) ⁵².

O primeiro indício do defeito de opsonização data de 1968, quando Miller et al. (1968) descreveu o caso de uma paciente, que padecia de uma infecção do trato respiratório recorrente e diarreia nos primeiros dois anos de vida. A paciente parecia não ter nenhuma outra imunodeficiência, mas os neutrófilos dela eram incapazes de fagocitar *Saccharomyces cerevisiae* eficientemente. Este defeito de opsonização pode ser encontrado em uma proporção alta (5-8%) de populações aparentemente saudáveis, mas é encontrado frequentemente em crianças com infecções inexplicadas ⁵¹.

Estado de deficiência da MBL é comum e parece predispor a inúmeras doenças infecciosas. Fortes associações com infecção bacteriana severa em pacientes neutropênicos e pacientes com meningite meningocócica tem sido apresentada. Susceptibilidade à infecção pelo HIV, infecção fúngica invasiva e por malária severa podem também estar associados à deficiência da MBL, embora dados relacionados a seus efeitos na progressão da infecção pelo HIV sejam conflitantes ³². A redução dos níveis séricos da MBL também já

foi relacionada ao aumento de algumas doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren ³⁴.

Existem ainda indícios da relação entre doenças imunológicas e o risco aumentado de infecções uterinas, assim como de abortos espontâneos de repetição (AER). Nessa linha de raciocínio, Kilpatrick et al. (1995) reportaram uma associação entre níveis baixos de MBL e AER. Surpreendentemente, os autores encontraram que a frequência da deficiência da MBL foi maior não apenas nas mulheres, mas também nos parceiros dos casais com AER (16 e 14%, respectivamente) quando comparado aos controles (<5%) ³⁴.

Babula et al. (2003) observaram uma frequência maior do alelo variante da MBL em mulheres na Latvia com infecção vaginal recorrente por *Candida sp*, comparativamente a mulheres saudáveis ⁵². Achado semelhante também foi verificado por Wojitan et al. (2011), que correlacionaram o polimorfismo no códon 54 com o aumento da frequência da candidíase vulvovaginal recorrente em mulheres brasileiras ⁵³. Babula et al. (2004) também estudaram 122 pacientes com vulvovestibulite e, comparativamente a 99 controles, a variante alelo B da MBL foi mais frequente ($p<0,01$) e os níveis de MBL foram menores ($p<0,0001$) no grupo estudo ⁵⁴.

Sziller et al. (2005) observaram que a variante do alelo B do MBL-2 esteve fortemente associada à oclusão das tubas uterinas em mulheres húngaras que foram submetidas a laparoscopia por hidrossalpinge. Além disso, foi demonstrado que homozigose para o alelo selvagem A provavelmente é protetor contra o dano tubário. Análise das pacientes, de acordo com a exposição prévia à infecção genital por *Chlamydia*, revelou

que o subgrupo de pacientes com tubas obstruídas e com anticorpos positivos para essa bactéria teve a prevalência maior do alelo B. Esses resultados sugerem que a MBL participa na defesa contra a *C. trachomatis* e que os portadores do alelo B do códon 54 provavelmente possuem susceptibilidade aumentada para obstrução tubária após infecção. Os autores sugeriram a hipótese que um defeito na primeira linha de defesa inata do hospedeiro em pacientes com a variante do códon 54 do gene que codifica para a MBL pode contribuir para persistência da *C. trachomatis* no trato genital feminino superior. Persistência desse microrganismo tem sido associada ao alto risco de formação de tecido cicatricial e, às vezes, oclusão das tubas uterinas²⁸.

Assim, frente aos danos causados à saúde da mulher (em consequência à infecção genital por *Chlamydia trachomatis*), à importância do sistema imune no combate a mesma, aos novos conhecimentos relacionados a fatores que podem interferir com a atuação do sistema imune (polimorfismos genéticos, dentre outros), ressalta-se a necessidade de melhor entender a fisiopatologia das sequelas resultantes do embate entre bactéria e hospedeiro. Nesse sentido, o melhor entendimento de tais processos eventualmente poderá ajudar no combate à infecção e suas importantes consequências.

A ausência de estudos que correlacionem a infecção por *Chlamydia trachomatis* e polimorfismo genético no códon 54 do gene que codifica a lectina ligadora de manose em mulheres brasileiras levou à elaboração do presente trabalho.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar se mulheres brasileiras portadoras de polimorfismo do gene que codifica para lectina ligadora de manose (MBL) apresentam diferentes susceptibilidades para a ocorrência de obstrução tubária, na presença ou ausência de infecção prévia por *Chlamydia trachomatis*.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Estudo tipo caso-controle.

3.2 Cálculo Amostral

Baseado na prevalência do genótipo selvagem do polimorfismo no códon 54 (MBL) em mulheres saudáveis de 82% e adotando-se confiança de 95% e poder de 80%, espera-se encontrar um percentual máximo de genótipo selvagem em mulheres com obstrução tubária de 62%. Tendo essa diferença como interesse, o número necessário de mulheres em cada grupo para a realização do estudo é de 75. O cálculo da amostra segue metodologia descrita em Fischer & Belle, 1993 ⁵⁵.

3.3 Local de Realização

O presente estudo foi realizado na Divisão de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Os setores envolvidos foram 1) Imunologia, Genética e Infecções do Trato Reprodutivo 2) Laparoscopia 3) Centro de Reprodução Humana.

O projeto de pesquisa foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp (Anexo A) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (Anexo B).

3.4 Pacientes

As pacientes do grupo estudo (n=75) foram selecionadas do Setor de Imunologia, Genética e Infecções do Trato Reprodutivo, do Centro de Reprodução Humana e do Setor de Laparoscopia da divisão Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Todas as pacientes tinham obstrução tubária, documentada por histerossalpingografia.

As pacientes do grupo controle (n=75) foram selecionadas no Setor de Laparoscopia, onde aguardavam laqueadura tubária, por apresentar prole constituída. Todas foram submetidas a esterilização por via laparoscópica, não apresentando alterações morfológicas das tubas uterinas no momento da cirurgia. A patência das mesmas foi confirmada por cromotubagem.

Os dois grupos foram constituídos com características epidemiológicas semelhantes.

Critérios de inclusão (grupo estudo):

1. Menacme
2. Vida sexual ativa

3. Obstrução tubária

Critérios de exclusão (grupo estudo):

1. Gestação
2. Diagnóstico de neoplasias malignas
3. Doenças autoimunes
4. Uso de antibiótico nos últimos três meses prévios à coleta do material

Critérios de inclusão (grupo controle):

1. Menacme
2. Vida sexual ativa
3. Desejo de laqueadura tubária

Critérios de exclusão (grupo controle):

1. Obstrução tubária
2. Gestação
3. Diagnóstico de neoplasias malignas
4. Doenças autoimunes
5. Uso de antibiótico nos últimos três meses prévios à coleta do material

3.5 Método de Estudo

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (anexo C), as pacientes de ambos os grupos responderam questionário (anexo D) contemplando dados epidemiológicos, história clínica,

antecedente patológico e antecedentes ginecológicos e obstétricos (incluindo fatores de risco para doenças sexualmente transmitidas).

Foram coletados 10 ml de sangue periférico para a pesquisa de IgG antichlamydia. Em seguida, realizou-se coleta de células bucais, gentilmente rodando swab de algodão (*Foam-tip buccal cell collection swab-catch ALLTM Sample Collection Swab Epicentre Madison W153713 USA*) na face interna da bochecha, para obtenção de material para análise genética, com o objetivo de pesquisar o polimorfismo no códon 54 do gene que codifica a lectina ligadora de manose. Este material foi mantido a -80°C e, em momento oportuno, foi enviado a *Division of Immunology and Infectious Diseases of Weill Medical College of Cornell University*, de acordo com as normas técnicas vigentes (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma do estudo

3.5.1 Determinação do Polimorfismo Genético no Códon 54 do Gene que codifica a Lectina Ligadora de Manose (MBL)

O DNA foi extraído de células da mucosa coletadas através de *swabs* bucais, conforme descrito anteriormente. As amostras foram descongeladas, lavadas e ressuspensas em uma solução detergente não-iônica a 1% (Brij 35 com Tris buffer), contendo 5 mg/ml de proteinase K. As células foram

lisadas por incubação a 56°C por 60 minutos e a proteinase K foi então inativada, aumentando-se a temperatura para 95°C por 10 minutos.

Os reagentes para a reação de PCR estavam guardados a -20°C no freezer; para o descongelamento foram colocados em gelo por aproximadamente 20 minutos.

Os lisados celulares foram diluídos a 1:5 em 10 mmol/l de Tris-HCl, que continha 1.5 mmol/l MgCl₂; 50mmol/l de KCl; 0.2 mmol/l de trifosfato deoxyadenosina, trifosfato deoxytidina, trifosfato deoxyguanosina, trifosfato timidina; 1,25 unidades de Taq DNA polimerase; e 30 pmol de *primers* que amplificam o códon 54, região polimórfica do gene da MBL. As amostras foram incubadas em termociclador. Após, os amplicons de PCR foram digeridos por incubação a 37°C por 18 horas com a endonuclease Ban I (New England Bio Labs) em tampão fornecido pelo fabricante.

Primers oligonucleotídeos para o gene do MBL:

5' -AGA ATT CGT AGG ACA GAG GGC ATG CTC-3'

5' -AGG ATC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG-3'

Fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2% e corados com etil bromídeo. Digestão com Ban I resultou na formação de dois fragmentos (260 e 89 pares de bases) para o alelo A (selvagem), ou em apenas um fragmento não-cortado (349 pares de bases) para o alelo B (mutante).

3.6 Análise estatística

Os dados foram digitados e armazenados em planilha eletrônica do *Microsoft Office Excel* 2013. Finalizada essa etapa, os dados foram importados para o programa estatístico SPSS versão 21 onde foram realizadas as análises estatísticas.

Para análise das características populacionais dos grupos estudo e controle, foi utilizada estatística descritiva (frequência absoluta e relativa em porcentagem). O teste correspondente para cada tipo de variável foi utilizado, dependendo da classificação (variável contínua ou frequência; paramétrica ou não-paramétrica). O teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* foi usado para determinar a parametricidade dos dados de idade. Após esse teste foi usado o teste de *Mann-Whitney* para compará-los. Para os dados com variáveis medidas em frequência, foram usados os testes de qui-quadrado de *Pearson*, com ou sem correção de *Yates* (conforme o caso), e o teste G com correção de *Williams*, quando necessário.

O *Odds ratio* com intervalo de confiança de 95% foi utilizado para inferir se cada variável laboratorial (genótipos homozigóticos selvagens AA, heterozigóticos AB, homozigóticos BB; e alelos selvagem A ou variante B; além da presença IgG antichlamydia) se mostrava como fator de risco ou de proteção para obstrução tubária em pacientes infectadas ou não pela *Chlamydia trachomatis*. As variáveis foram dicotomizadas para o cálculo do *Odds* e a quantificação do grau de associação entre os fatores foi inferido

pelo valor do *Odds*, acima de 1 (fator de risco) ou abaixo de 1 (fator de proteção - diminui o risco).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas e história clínica

Características demográficas e história clínica de ambos os grupos (estudo e controle) encontram-se representadas na tabela 1. A média de idade das mulheres com tubas obstruídas (36,4) foi pouco menor que as com tubas pérvias (37,2), porém sem diferença estatisticamente significativa ($p= 0,49$). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as variáveis: raça ($p= 0,24$); estado civil ($p= 0,72$); idade da primeira relação sexual ($p= 0,28$); número de parceiros ($p= 0,60$); número de abortamentos ($p= 1,00$); número de partos prematuros ($p= 1,00$); tratamento de infecção genital prévia ($p= 0,87$) e cirurgia abdominal anterior ($p= 0,18$).

Com relação às variáveis número de gestações ($p<0,01$); número de partos ($p<0,01$) e uso de contracepção hormonal ($p= 0,04$), observa-se diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre os grupos. As mulheres com tubas pérvias apresentaram maior número de partos e gestações, enquanto que as mulheres com obstrução tubária referiram maior uso de contraceptivo (Tabela 1).

Quando as variáveis demográficas e antecedentes sexuais foram analisadas nas pacientes com ou sem infecção prévia pela *Chlamydia trachomatis*, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis pesquisadas, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 1 - Distribuição das principais características demográficas do grupo estudo (mulheres com obstrução tubária n=75) e do grupo controle (mulheres com tubas prvias n=75)

Variáveis	Tubas obstruídas (%)	Tubas pérvias (%)	Teste estatístico	p-valor
Idade (média $\pm$ desvio padrão)	36,4 $\pm$ 5,3	37,2 $\pm$ 6,2	Z(U)= 0,68	p= 0,49
Raça				
Branca	43 (57,3%)	34 (45,3%)	$\chi^2 = 2,90$	p= 0,24
Parda	23 (30,7%)	33 (44,0%)		
Negra	9 (12,0%)	8 (10,7%)		
Estado civil				
Casada/união estável	69 (92,0%)	65 (86,7%)	Teste G (William)= 1,34	p= 0,72
Solteira	4 (5,4%)	7 (9,3%)		
Divorciada	1 (1,3%)	2 (2,7%)		
Viúva	1 (1,3%)	1 (1,3%)		
Idade 1� relação sexual				
≤ 15	18 (24,0%)	25 (33,0%)	$\chi^2_{(Yates)} = 1,17$	p= 0,28
> 15	57 (76,0%)	50 (66,7%)		
N� de parceiros				
≤ 3	48 (64,0%)	52 (69,3%)	$\chi^2_{(Yates)} = 0,28$	p= 0,60
> 3	27 (36,0%)	23 (30,7%)		
N� de gestações				
≤ 2	66 (88,0%)	40 (53,3%)	$\chi^2_{(Yates)} = 20,01$	p< 0,01*
> 2	9 (12,0%)	35 (46,7%)		
N� de partos				
≤ 2	72 (96,0%)	45 (60,0%)	$\chi^2_{(Yates)} = 26,27$	p< 0,01*
> 2	3 (4,0%)	30 (40,0%)		
N� de abortamentos				
≤ 1	68 (90,7%)	69 (92,0%)	$\chi^2_{(Yates)} = 0,00$	p= 1,00
> 1	7 (9,3%)	6 (8,0%)		
N� de partos prematuros				
≤ 1	73 (97,3%)	72 (96,0%)	$\chi^2_{(Yates)} = 0,00$	p= 1,00
> 1	2 (2,7%)	3 (4,0%)		
Uso contraceptivo hormonal				
Sim	53 (70,7%)	40 (53,3%)	$\chi^2_{(Yates)} = 4,10$	p= 0,04*
Não	22 (29,3%)	35 (46,7%)		
Tratamento Infecção Prévia				
Sim	48 (64,0%)	46 (61,3%)	$\chi^2_{(Yates)} = 0,03$	p= 0,87
Não	27 (36,0%)	29 (38,7%)		
Cirurgia abdominal anterior				
Sim	44 (58,7%)	53 (70,7%)	$\chi^2_{(Yates)} = 1,87$	p= 0,18
Não	31 (41,3%)	22 (29,3%)		

FONTE: Hospital das Clnicas da FMUSP;

Z(U) –Teste de Mann-Whitney; χ^2 – Qui-quadrado de Contingncia; $\chi^2_{(Yates)}$ - Qui-quadrado de Pearson com correo de Yates.

Tabela 2 - Distribuição das características demográficas e de antecedentes sexuais dos grupos estudo e controle e o *status* de infecção prévia pela *Chlamydia trachomatis*

Variáveis	Com Infecção (%)	Sem Infecção (%)	OR	IC -95%	p-valor
Idade					
≤35 anos	17 (48,6)	57 (49,6)	0,96	0,45-2,05	0,93
>35 anos	18 (51,4)	58 (50,4)			
Estado civil					
Casada/união estável	30 (85,7)	98 (85,2)	1,04	0,35-3,06	0,84
Não casada/ solteira	5 (14,3)	17 (14,8)			
Idade 1ª relação sexual					
≤15 anos	12 (34,3)	31 (27,0)	1,41	0,62-3,18	0,53
>15 anos	23 (65,7)	84 (73,0)			
Nº de parceiros					
≤3	21 (60,0)	77 (67,0)	0,74	0,34-1,61	0,58
>3	14 (40,0)	38 (33,0)			
Nº de parceiros (6 meses)					
≤1	32 (91,4)	109 (94,8)	0,59	0,14-2,48	0,75
>1	3 (8,6)	6 (5,2)			
Sexo anal					
Sim	5 (14,3)	27 (23,5)	0,54	0,19-1,54	0,35
Não	30 (85,7)	88 (76,5)			
Sexo oral					
Sim	17 (48,6)	57 (49,6)	0,96	0,45-2,05	0,93
Não	18 (51,4)	58 (50,4)			
Nº de gestações					
≤2	23 (65,7)	83 (72,1)	0,74	0,33-1,66	0,60
>2	12 (34,3)	32 (27,8)			
Nº de partos					
≤2	27 (77,1)	90 (78,3)	0,94	0,38-2,32	0,93
>2	8 (22,9)	25 (21,7)			
Nº de abortamentos					
≤1	31 (88,6)	106 (92,2)	0,66	0,19-2,28	0,75
>1	4 (11,4)	9 (7,8)			
Nº partos prematuros					
≤1	34 (97,1)	104 (90,4)	3,60	0,45-28,88	0,35
>1	1 (2,9)	11 (9,6)			
Uso contraceptivo					
Sim	27 (77,1)	83 (72,2)	1,30	0,54-3,16	0,72
Não	8 (22,9)	32 (27,8)			
Tratamento infecção prévia					
Sim	22 (62,9)	72 (62,6)	1,01	0,46-2,21	0,86
Não	13 (37,1)	43 (37,4)			
Cirurgia anterior					
Sim	23 (65,7)	77 (67,0)	0,94	0,43-2,10	0,95
Não	12 (34,3)	38 (33,0)			

FONTE: Hospital das Clínicas da FMUSP. OR, razão de chances; IC, intervalo de confiança de 95%; N=35 com infecção; N= 115 sem infecção. ** Resultado significativo.

Quando comparados os sintomas pesquisados nos grupos (tubas obstruídas e pérvias), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os mesmos para dor hipogástrica e dismenorreia. O grupo estudo (mulheres com obstrução tubária) apresentou maior frequência dessas queixas, além de ter apresentado menor frequência de pacientes assintomáticas (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre sintomas referidos pelo grupo estudo (mulheres com obstrução tubária n=75) e pelo grupo controle (mulheres com tubas pérvias n=75)

Sintomas	Tubas obstruídas	Tubas pérvias	Qui-quadrado X ² (Yates)	p-valor
Assintomática	31 (41,3%)	52 (69,3%)	4,82	0,03*
Corrimento	22 (29,3%)	15 (20,0%)	0,97	0,32
Dispareunia	18 (24,0%)	8 (10,6%)	3,12	0,08
Dor hipogástrica	30 (40,0%)	14 (18,7%)	5,11	0,02*
Queimação	5 (6,7%)	6 (8,0%)	0,09	1,00
Prurido	11 (14,7%)	11 (14,7%)	0,00	1,00
Dismenorreia	49 (65,3%)	30 (40,0%)	4,10	0,04*
Metrorragia	20 (26,7%)	15 (20,0%)	0,46	0,50
Menorragia	22 (29,3%)	17 (22,7%)	0,41	0,52

FONTE: Hospital das Clínicas da FMUSP. N=75 Tubas obstruídas; N=75 Tubas pérvias.

* Resultado significativo.

A Tabela 4 ilustra a distribuição de pacientes conforme genótipo e alelos do gene que codifica a MBL e os sintomas ginecológicos mais comuns por elas referidos. Foi identificado que pacientes com genótipo AA são mais assintomáticas, resultado estatisticamente significativo entre os grupos estudo e controle.

Foi calculado o Odds ratio para os alelos (A e B) das pacientes nos grupos estudo e controle. Houve diferença estatisticamente significativa somente nas pacientes assintomáticas (Tabela 4) com OR = 0,31 (IC 95% de 0,13 - 0,77). Para os outros sintomas, o Odds não apresentou diferença significativa ($p>0,05$), com intervalos de confiança passando pela unidade: dor hipogástrica OR= 0,38 (IC 95% de 0,07 – 1,85); dismenorreia OR= 0,39 (IC 95% de 0,14 – 1,13).

Tabela 4 - Polimorfismo do gene que codifica a MBL e sintomas em mulheres com e sem obstrução tubária

Sintomas	Genótipo/Alelo	Tubas obstruídas (%)	Tubas pérvias (%)	p-valor
Assintomática	AA	17 (54,8)	43 (82,7)	0,02 ^a
	AB	12 (38,7)	9 (17,3)	
	BB	2 (6,5)	-	
	Alelo A	46 (76,7)	95 (91,3)	0,02 ^b
	Alelo B	14 (23,3)	9 (8,7)	
Dor hipogástrica	AA	20 (66,7)	12 (85,7)	0,43
	AB	9 (30,0)	2 (14,3)	
	BB	1 (3,3)	-	
	Alelo A	49 (83,1)	26 (92,9)	0,36
	Alelo B	10 (16,9)	2 (7,1)	
Dismenorreia	AA	31 (63,3)	25 (83,3)	0,12
	AB	16 (32,7)	5 (16,7)	
	BB	2 (4,0)	-	
	Alelo A	78 (81,3)	55 (91,7)	0,12
	Alelo B	18 (18,7)	5 (8,3)	

FONTE: Hospital das Clnicas da FMUSP. ^a Resultado significativo teste-G (Williams). ^b Resultado significativo teste qui-quadrado de Pearson comparando os resultados do Odds Ratio. Os Gentipos foram determinados pela contagem direta e a frequncia de alelos foi determinada pela contagem dividida pelo nmero de cromossomos.

A tabela 5 apresenta a distribuição de pacientes, conforme resultado da imunoglobulina G (IgG) antichlamydia, e os principais sintomas referidos por elas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre esses grupos para nenhum dos sintomas pesquisados.

Tabela 5 - Comparação entre sintomas mais comuns referidos por pacientes com resultado positivo ou negativo da IgG antichlamydia

Sintomas	IgG antichlamydia positivo (%)	IgG antichlamydia negativo (%)	Qui-quadrado X ² (Yates)	p-valor
Assintomática				
Sim	18 (51,4)	65 (56,5)	0,11	0,74
Não	17 (48,6)	50 (43,5)		
Corrimento				
Sim	10 (28,6)	27 (23,5)	0,15	0,70
Não	25 (71,4)	88 (76,5)		
Dispareunia				
Sim	8 (22,9)	20 (17,4)	0,23	0,63
Não	27 (77,1)	95 (82,6)		
Dor hipogástrica				
Sim	12 (34,3)	32 (27,8)	0,27	0,60
Não	23 (65,7)	83 (72,2)		
Queimação				
Sim	2 (5,8)	11 (9,6)	0,13	0,71
Não	33 (94,2)	104 (90,4)		
Prurido				
Sim	4 (11,4)	18 (15,7)	0,12	0,73
Não	31 (88,6)	97 (84,3)		
Dismenorreia				
Sim	17 (48,6)	62 (53,9)	0,13	0,72
Não	18 (51,4)	53 (46,1)		
Metrorragia				
Sim	11 (31,4)	24 (20,9)	1,13	0,29
Não	24 (68,6)	91 (79,1)		
Menorragia				
Sim	11 (31,4)	28 (24,4)	0,38	0,54
Não	24 (68,6)	87 (75,6)		

FONTE: Hospital das Clínicas da FMUSP. N=35 Com infecção prévia; N=115 Sem infecção prévia.

4.2 Distribuição dos genótipos da MBL e condição de permeabilidade das tubas uterinas

A distribuição dos genótipos e alelos que codificam a MBL em mulheres com tubas uterinas pérvias ou obstruídas foi comparada (Tabela 6). As mulheres com tubas obstruídas (grupo estudo) tiveram uma menor incidência de homozigose no alelo selvagem A (58,7%) em relação às mulheres com tubas pérvias (84%). A incidência de heterozigose (AB) foi maior nas mulheres com tubas obstruídas (36%), contra (16%) das pacientes do controle. Já a incidência na variante homozigótica B (BB) apareceu em quatro pacientes, apenas do grupo estudo (5,3%). A incidência do alelo selvagem tipo A nas mulheres com obstrução tubária foi de 76,7%, enquanto que nas mulheres do grupo controle foi de 92%. O alelo variante B foi incidente em 23,3% das mulheres do grupo estudo e em apenas 8% nas mulheres do grupo controle.

Quando comparados os dados através do teste qui-quadrado de *Pearson*, este mostrou diferença estatisticamente significativa entre os genótipos homozigótico AA e heterozigótico AB entre os grupos estudo e controle ($\chi^2_{\text{Yates}} = 7,95$; $p < 0,01$). Com relação à presença do alelo selvagem A e do variante B, também houve diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_{\text{Yates}} = 12,21$; $p < 0,01$). O cálculo do *Odds Ratio* (IC-95%) também mostrou diferença significativa entre a presença dos genótipos homozigótico AA e heterozigóticos AB nos grupos investigados, com OR= 0,29 ($p < 0,01$; IC-95%

0,14-0,68); e para a presença do alelo selvagem A em comparação ao alelo variante B foi obtido OR= 0,31 ($p<0,01$; IC-95% 0,14-0,58).

Enquanto a distribuição de genótipo das mulheres com tubas prvias estava em equilbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,0038$; $p = 0,55$), a distribuio de gentipo entre as mulheres com obstruo tubria no estava em equilbrio Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,0002$; $p < 0,05$).

Tabela 6 - Associao entre o polimorfismo no cdon 54 do gene que codifica a lectina ligadora de manose (MBL) e condio de permeabilidade das tubas uterinas

Genótipo ou Alelos	Tubas obstru��das (75) (%)	Tubas pérvias (75) (%)	OR (IC-95%)	p-valor
AA	44 (58,7%)	63 (84%)	0,31 (0,14-0,68)	$p<0,01$
AB	27 (36%)	12 (16%)		
BB	4 (5,3%)	- (0%)		
Alelo A	115 (76,7%)	138 (92%)	0,29 (0,14-0,58)	$p<0,01$
Alelo B	35 (23,3%)	12 (8%)		

FONTE: Hospital das Clnicas da FMUSP.

OR, razo de chances; IC, intervalo de confiana de 95%; A - alelo selvagem; B alelo variante. Os Gentipos foram determinados pela contagem direta e a frequncia de alelos foi determinada pela contagem dividida pelo nmero de cromossomos

4.3 Presença de anticorpos IgG antichlamydia nos grupos estudados

As associações entre obstrução das tubas uterinas e IgG positivo para *Chlamydia trachomatis* estão resumidas na tabela 7.

Tabela 7 - Associação entre IgG antichlamydia e condição de permeabilidade das tubas uterinas

Sorologia	Tubas obstruídas (75) (%)	Tubas pérvias (75) (%)	OR (IC-95%)	p-valor
IgG <i>Chlamydia</i> +	17 (22,7%)	18 (24,0%)	0,92 (0,44-1,99)	p= 1,00
IgG <i>Chlamydia</i> -	58 (77,3%)	57 (76,0%)		

FONTE: Hospital das Clnicas da FMUSP. N=35 Com infeco prvia; N=115 Sem infeco prvia. OR, razo de chances; IC, intervalo de confiana de 95%; (+) resultado positivo; (-) resultado negativo.

A prevalncia da infeco pela *Chlamydia trachomatis* identificada pela soropositividade de anticorpos IgG antichlamydia foi de 22,7% das mulheres com obstruo tubria; e de 24% no grupo controle. No houve diferena estatstica entre os grupos estudados, analisada pelo teste de qui-quadrado de *Pearson* ($\chi^2 = 0,85$; p= 1,00).

4.4 Comparação entre o polimorfismo do gene que codifica a MBL e sorologia para a *Chlamydia trachomatis* entre os grupos estudo e controle

Podemos observar na tabela 8 que só existe diferença significativa entre as razões de chances para os casos com sorologia negativa para a *Chlamydia trachomatis* entre as pacientes portadoras do alelo B. Não houve diferença significativa entre os genótipos.

Tabela 8 - Associação entre o polimorfismo do gene que codifica a MBL e a sorologia para *Chlamydia* na oclusão da tuba uterina

Genótipo ou Alelos	Sorologia <i>Chlamydia</i>	Tubas obstruídas (%)	Tubas pervias (%)	Qui-quadrado χ^2_{Yates}	p-valor
A,A	Positiva	10 (58,8)	15 (83,3)	0,64	0,42
A,B	Positiva	7 (41,2)	3 (16,7)	**	**
B,B	Positiva	- (0,0)	- (0,0)	-	-
A,A	Negativa	34 (58,6)	48 (82,2)	2,06	0,15
A,B	Negativa	20 (34,5)	9 (15,8)	3,49	0,06
B,B	Negativa	4 (6,9)	- (0,0)	-	-
Alelo A	Positiva	27 (79,4)	33 (91,7)	0,42	0,52
Alelo B	Positiva	7 (20,6)	3 (8,3)	**	**
Alelo A	Negativa	88 (75,9)	105 (92,1)	1,33	0,25
Alelo B	Negativa	28 (24,1)	9 (7,9)	8,76	p<0,01*

FONTE: Hospital das Clínicas da FMUSP. N=75 Genótipos; N=150 Alelos. χ^2_{Yates} Qui-quadrado com correção de Yates. p<0,01* Resultado significativo. ** Não pode ser calculado o teste.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Obstrução tubária é uma importante causa de infertilidade feminina, estimando-se que seja encontrada em 25-35% das mulheres com dificuldade para engravidar ⁵⁶⁻⁵⁸. A etiologia da obstrução é variada, porém a doença inflamatória pélvica (DIP) representa mais de 50% dos casos ⁵⁶. Outras condições que podem provocar a obstrução são: laqueadura tubária, endometriose, cirurgia pélvica e tuberculose genital ^{59, 60}.

Infecção pela *Chlamydia trachomatis* (CT) é o primeiro fator etiológico da obstrução tubária, e responde por cerca de 40-50% da DIP ⁶¹. Após um único episódio de DIP, 11-15% das mulheres tem suas tubas obstruídas e, a cada nova infecção, a taxa de infertilidade aproximadamente dobra. Além da infecção pela CT, outras bactérias também potencialmente podem causar dano tubário; entre elas destacam-se: *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis* ⁶².

No presente estudo, a causa investigada de obstrução tubária foi a infecção prévia pela CT. Outras bactérias não foram pesquisadas e pacientes com evidência de tubas aderidas à histerossalpingografia, como sequela de endometriose e cirurgia pélvica, não foram incluídas. Sendo assim, a prevalência encontrada de mulheres que tiveram infecção pela *Chlamydia trachomatis* foi de 23,3% na amostra coletada de 150 mulheres. O grupo estudo (mulheres com tubas obstruídas) apresentou 22,7% de infecção prévia pela CT, enquanto que o grupo controle (mulheres com

tubas prvias) apresentou 24%, no havendo diferena estatisticamente significativa.

Entre os grupos estudados, no houve diferena estatisticamente significativa na maioria das variveis demogrficas pesquisadas. A mdia de idade foi de 36,4 e 37,2 anos no grupo estudo e controle, respectivamente. A raa branca foi mais prevalente em ambos os grupos, assim como a maioria das pacientes declarou seu estado civil como casada. No foi possvel identificar que pacientes com tubas obstrudas tenham apresentado maior frequncia de fatores de risco para infeco genital (mais de dois parceiros sexuais nos ltimos 6 meses, segundo a OMS, caracteriza promiscuidade), j que no houve diferena entre os grupos quanto ao incio da atividade sexual e ao nmero de parceiros sexuais prvios. Pacientes com tubas prvias apresentaram maior nmero de gestaes e partos, enquanto que pacientes com tubas obstrudas tiveram histria de maior uso de mtodo contracepcional hormonal. Tal resultado era esperado, tendo em vista que o grupo controle foi formado por pacientes com prole constituda e sem dano tubrio, confirmado pela cromotubagem durante o procedimento videolaparoscpico. Porm no h descrio na literatura que uso de contraceptivo hormonal aumente o risco para a infeco pela CT e suas sequelas, muito embora o uso de tal mtodo altere o comportamento de casais, que passam a praticar sexo desprotegido ⁶³. No houve diferena entre os grupos quando questionado tratamento prvio de infeco genital, corroborando que a infeco pela *Chlamydia trachomatis* costuma ser assintomtica, no justificando a procura do ginecologista para

diagnóstico/tratamento. Também não houve diferença do antecedente de cirurgia abdominal prévia entre os grupos, contribuindo para excluir esse fator de confusão da amostra.

Quando analisadas as 35 pacientes com infecção prévia pela *Chlamydia trachomatis* presentes em ambos os grupos (estudo e controle), não foi possível observar diferenças nas variáveis demográficas e antecedentes sexuais quando comparadas ao grupo sem infecção. Dessas 35 pacientes com IgG antichlamydia positivo, a maioria era assintomática (51,4%), como também apresentado em diversos estudos ⁶³⁻⁶⁵. Das que apresentaram sintomas, a queixa mais comum foi dismenorreia (48,6%), seguida por dor em hipogastro (34,3%), metrorragia (31,4%) e menorragia (31,4%).

Pelo fato da maioria das mulheres infectadas pela CT apresentarem-se assintomáticas, uma importante parcela permanece não tratada e eventualmente desenvolve a DIP, que pode resultar em gravidez ectópica, dor pélvica crônica e obstrução tubária ⁶³. Tal desfecho foi analisado nesse trabalho, e se observa que pacientes com obstrução tubária permanecem, na sua maioria (41,3%), sem apresentar sintomas. Quando sintomáticas, dismenorreia (65,3%) e dor em hipogastro (40,0%) são os queixas mais comuns. Esses resultados foram estatisticamente significativos, quando comparados aos apresentados pelo grupo de pacientes com tubas pérvias. Não há evidência na associação entre gravidade dos sintomas e sequela da infecção pela *Chlamydia trachomatis*. Em muitos casos, uma resposta imune deficiente pode ser mais prejudicial do que a própria infecção subjacente ⁶⁶.

Os diversos fatores associados à evasão da CT da resposta imune do hospedeiro, à migração do trato genital inferior feminino para o trato superior, e a sua habilidade de persistência nas tubas uterinas ainda não são totalmente elucidados ²⁸. Contudo, sabe-se que a lectina ligadora de manose (MBL) reconhece grupos de açúcares na superfície de membrana de todos os sorotipos da CT, impedindo que a mesma se ligue às células do hospedeiro ⁶⁷. A MBL é um importante componente do sistema imune inato, sendo capaz de ativar o sistema complemento, modular a inflamação e promover apoptose ⁴⁷. O gene (MBL2) que codifica a MBL é polimórfico, sendo reconhecidas seis possíveis mudanças na sequência do DNA, que resultam na formação de uma proteína instável, sem atividade funcional ou níveis séricos alterados da mesma ⁵¹.

No presente estudo, o polimorfismo genético estudado foi no códon 54 do éxon 1 do MBL2. A presença do alelo variante B traz especialmente mudanças estruturais na proteína codificada, que costuma ser rapidamente degradada ⁵⁰. Identificou-se que pacientes com tubas pérvias (grupo controle) apresentaram menor incidência do polimorfismo do gene que codifica a MBL. O genótipo AA estava presente em 84% das pacientes sem dano tubário; o genótipo AB, em 12% dessas pacientes; enquanto não houve nenhuma representante do grupo controle apresentando homozigose para o polimorfismo (BB). Todavia, o genótipo AA esteve presente em apenas 58,7% das pacientes do grupo com obstrução tubária (grupo estudo), enquanto o genótipo heterozigoto para o polimorfismo (AB) estava representado em 36% dessas pacientes e a homozigose BB em 5,3% das

pacientes com tubas obstruídas. Tal diferença de representatividade dos genótipos entre os grupos estudados se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Ainda foi observado que o alelo variante B esteve presente em 23,3% das pacientes do grupo estudo e em apenas 8% das pacientes do grupo controle ($p < 0,01$).

Sziller e colaboradores obtiveram resultado semelhante em estudo realizado na Húngria: pacientes com tubas pérvias carregavam 13,5% do genótipo AB, enquanto pacientes com tubas obstruídas carregavam 31,9% desse mesmo genótipo ($p < 0,01$)²⁸. Em estudo realizado na Estônia por Laisk e colaboradores, não houve diferença na distribuição do polimorfismo no códon 54 entre o grupo estudo (tubas obstruídas) e controle (tubas pérvias)⁶⁶.

O teorema de Hardy-Weinberg ou princípio do equilíbrio gênico afirma que, se nenhum fator evolutivo atue sobre uma população que satisfaça certas condições, as frequências de seus alelos permaneceriam inalteradas ao longo das gerações. Para que esse princípio seja respeitado, faz-se necessário que a população seja suficientemente grande, a fim de que o cruzamento de indivíduos de diferentes genótipos ocorra ao acaso⁶⁸. No presente estudo, o grupo controle se caracterizou no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,0038$; $p = 0,55$), porém o grupo das pacientes com obstrução tubária não apresentou tal comportamento ($\chi^2 = 0,0002$; $p < 0,05$). Resultado idêntico foi observado por Sziller e colaboradores em 2007. Tal divergência entre os grupos estudados corroboram a associação entre a variação genética e o risco da patologia em estudo.

Quando analisadas as 35 pacientes com infecção prévia pela *Chlamydia trachomatis*, observou-se que 18 (51,4%) das mesmas apresentaram tubas prvias. Destas, o gentipo AA estava presente em 15 (83,3%) mulheres e apenas 3 (16,7%) carregavam o gentipo AB. Em contrapartida, das 17 (48,6%) pacientes com infeco prvia pela CT e que apresentavam obstruo tubria, o gentipo AA e o AB estavam presentes em 10 (58,8%) e 7 (41,2%), respectivamente. Apesar dessa diferena no ser estatisticamente significativa, pode-se inferir que a presena do alelo selvagem A e, por consequncia, a presena da MBL (estruturalmente adequada e em nveis sricos normais) no conseguiu evitar a infeco pela CT; porm, possivelmente, evitou a persistncia da bactria e a consequente obstruo tubria.

Por outro lado, das 115 pacientes sem evidncia de infeco prvia pela CT, cerca de 50% delas tinham obstruo tubria e o alelo B esteve presente em 24,1% dessa amostra. Em oposio, os outros 50% apresentavam tubas prvias e o gentipo AA e AB apresentavam as seguintes frequncias: 82,2% e 15,8%, respectivamente. O alelo B foi carregado em apenas 7,9% das pacientes com tubas prvias e CT negativa. Tal diferena de representatividade do alelo variante B entre os grupos estudados e sem evidncia de infeco prvia pela CT gerou o $p < 0,01$, semelhana dos resultados encontrados por Sziller e colaboradores²⁸.

Observa-se, ento, que no grupo de pacientes com tubas obstrudas, cerca de 22,7% delas tem, como provvel etiologia, a infeco prvia pela *Chlamydia trachomatis*. Vale o adendo que a imunoglobulina G (IgG) no

perene na circulação sanguínea, embora existam evidências que esse anticorpo seja detectável no soro por até mais de 8 anos após contato com o antígeno ⁶¹. Dessa forma, existe a possibilidade de que a prevalência da infecção pela CT nesse grupo possa ser ainda maior do que a apresentada neste estudo. No subgrupo de pacientes com tubas obstruídas e sem evidencia de infecção prévia pela CT, a prevalência do alelo variante B foi marcante. Tal resultado suporta a teoria que outras bactérias, além da CT, também podem provocar oclusão tubária, e o controle da infecção das mesmas possivelmente sofre regulação mediada pela MBL.

O presente estudo apresenta limitações, como casuística modesta, ausência de pesquisa de infecção prévia por outros patógenos que potencialmente danificam as tubas como *Mycoplasmas*, *Ureaplasma urealyticum* ou *Neisseria gonorrhoeae*, dentre outros.

Em suma, a presença do alelo B no gene da MBL foi mais prevalente nas mulheres com tubas obstruídas ($p < 0,01$). Em contrapartida, não houve associação entre a presença de anticorpos (IgG) antichlamydia e a permeabilidade tubária. É interessante especular, dessa forma, que pacientes com quadro agudo da infecção pela CT possam se beneficiar da pesquisa do polimorfismo da MBL. Aquelas portadoras do alelo B, por serem mais susceptíveis a complicações da infecção, provavelmente seriam beneficiadas recebendo tratamento mais prolongado, ou com múltiplos antibacterianos, a fim de compensar a relativa deficiência da imunidade inata.

Assim, espera-se que subsequentes pesquisas na área sejam realizadas, particularmente objetivando esclarecer ainda mais o papel das variações genéticas na atuação do sistema imune e suas consequências para o hospedeiro. Tais aspectos certamente apontarão para as diferentes susceptibilidades individuais frente aos diferentes agentes infecciosos e para a necessidade de condutas terapêuticas individualizadas. Esses conhecimentos adquiridos através das pesquisas certamente irão contribuir para uma melhor atenção e cuidados à saúde reprodutiva das mulheres.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os achados sugerem que, embora a exposição à *Chlamydia trachomatis* tenha sido semelhante em ambos os grupos, a presença do alelo variante B do gene que codifica para a MBL aumenta o risco de desenvolvimento da obstrução tubária, subsequente à infecção pela CT ou outros agentes infecciosos. Nas mulheres brasileiras avaliadas a presença de tal polimorfismo genético aumentou a probabilidade de obstrução tubária em consequência de uma infecção do trato genital.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17.06.09, **APROVOU** os documentos abaixo referentes ao Protocolo de Pesquisa nº 0491/09, intitulado: **"Infecção por Chlamydia trachomatis, obstrução tubária e polimorfismo genético no códon 54 do gen que codifica para a lecitina ligadora de manose (MBL) em mulheres brasileiras"**apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE OBSTERICIA E GINECOLOGIA**.

- Protocolo do Estudo
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Questionário

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c").

A pesquisadora deverá aguardar a aprovação da **CONEP** para iniciar a pesquisa.

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Iara Moreno Linhares

CAPPesq, 18 de junho de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B - Aprovação do CONEP

Memo.CAPPesq – 205/10

São Paulo, 01 de Abril de 2010.

Ilma. Sra.
Dra. Iara Moreno Linhares
DD Pesquisadora
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Segue anexo para conhecimento cópia do parecer nº 164/10, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS referente à APROVAÇÃO do Protocolo de Pesquisa nº 0491/09 – intitulado "Infecção por *Chlamydia trachomatis*, obstrução tubária e polimorfismo genético no códon 54 do gen que codifica para a lecitina ligadora de manose (MBL) em mulheres brasileiras."

Atenciosamente,

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696-142 fax: 011 - 3069 6-192 - e-mail: cappesq@conet.usp.br
Rita

Anexo C – TCLE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Infecção por *Chlamydia trachomatis*, obstrução tubária e polimorfismo genético no condon 54 do gen que codifica para lecitina ligadora de manose (MBL) em mulheres brasileiras.”

PESQUISADOR: Lara Moreno Linhares

CARGO/FUNÇÃO: ... médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 29 034

UNIDADE DO HCFMUSP: .. Disciplina de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☒

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : início em junho de 2010 e final em junho de 2012.

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa para verificar se uma infecção genital ou a presença de obstrução nas tubas está associada a uma pequena alteração (chamada de polimorfismo) no gen que produz uma proteína de defesa do trato genital (proteína ligadora de manose - MBL). Gostaríamos de explicar a importância desse estudo e os passos envolvidos na participação.

1. As infecções genitais, dependendo do agente que as provoca, podem atingir as trompas e obstruí-las, causando infertilidade. Algumas mulheres têm maior facilidade de adquirir infecções do que outras e por isso apresentam maior risco de ficar com as trompas obstruídas.

O sistema imune do organismo é responsável pela defesa contra infecções. Estudos já demonstraram que mulheres que sofrem de infecções mais sérias provavelmente possuem alguma alteração no sistema imune que faz a defesa do trato genital contra bactérias e vírus.

Os genes são os responsáveis pelas características de cada pessoa, incluindo as características de defesa. Algumas vezes os genes podem apresentar pequenas alterações (polimorfismos) que influem na atividade dos componentes do sistema imune. Um importante componente do sistema imune é a proteína chamada "lectina ligadora de manose (MBL)". Estudos feitos nos Estados Unidos e na Europa mostraram que mulheres que apresentam polimorfismo no gen que determina a secreção dessa proteína têm maior risco de adquirir infecções genitais e também de ficarem com as tubas obstruídas em consequência das mesmas.

O objetivo desta pesquisa é avaliar se mulheres *brasileiras* portadoras de polimorfismos no gen que codifica para a lectina ligadora de manose (MBL) apresentam maior risco de infecção genital e também maior possibilidade de ficarem com as tubas obstruídas em consequência da infecção.

2. A senhora está sendo encaminhada para realizar uma laparoscopia, indicada por seu médico, como parte de seu diagnóstico ou tratamento nesta clínica. Caso concorde em participar da pesquisa sua laparoscopia será feita sem a menor alteração; apenas momentos antes do exame a senhora responderá a algumas perguntas formuladas por seu médico e terá uma pequena quantidade de sangue colhido (10 ml).
3. Além da laparoscopia já programada, serão feitos exames no sangue (anticorpos anti-clamídia) para detectar se a senhora teve ou tem uma infecção genital por clamídia (bactéria que causa infecção genital). Além disso, serão coletadas algumas células de sua boca, girando-se um cotonete de algodão algumas vezes contra a face interna da bochecha. Estas células da boca servirão para retirar DNA e estudar se existem alterações no gen que determina a produção da proteína lectina ligadora de manose. O material será enviado para o laboratório de Imunologia da Universidade de Cornell, nos Estados Unidos, sendo utilizado EXCLUSIVAMENTE para a realização desta pesquisa.

Observação: A senhora tem o direito de não responder a todas as perguntas do questionário que será apresentado por seu médico. Poderá recusar-se a responder caso considere que alguma pergunta possa deixá-la constrangida.

4. A participação na pesquisa envolve os mesmos riscos relacionados à realização da laparoscopia que a senhora será submetida e que já lhe foram explicados por seu médico laparoscopista. Além da laparoscopia que já havia sido programada, a senhora será submetida à coleta de pequena quantidade (10 ml) de sangue. O risco envolvido na coleta de sangue é mínimo, porém pode ocorrer dor de pequena intensidade pela picada da agulha.

- Poderá também ocorrer um pequeno desconforto quando o cotonete de algodão for girado na face interna da bochecha.**
5. Não existem maiores benefícios pessoais na participação, porém a senhora estará contribuindo para o melhor conhecimento sobre o assunto, o que poderá auxiliar na descoberta de melhores tratamentos. A senhora será informada sobre os resultados dos exames.
 6. Caso a senhora decida não participar do estudo terá garantidos os seus direitos de submeter-se à laparoscopia como previsto pelo seu médico e a continuar o acompanhamento na Disciplina de Ginecologia da FMUSP.
 7. Em qualquer etapa do estudo a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pelo mesmo, que estarão à disposição para esclarecer suas dúvidas. Os pesquisadores principais são os doutores Iara Moreno Linhares e Sergio Conti Ribeiro que poderão ser encontrados na Avenida Dr. Enéas Carvalho Aguiar s/n, telefones 3069-6000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
 8. Caso queira, a senhora poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo da continuidade de seu atendimento na instituição.
 9. Todas as informações obtidas no estudo serão CONFIDENCIAIS e analisadas em conjunto com as das outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
 10. A senhora terá o direito de conhecer os resultados da pesquisa, conforme estes sejam obtidos.
 11. Não haverá compensação financeira pela participação no estudo. E também não haverá algum tipo de despesa
 12. Os procedimentos envolvidos neste estudo não apresentam outros riscos senão os inerentes à realização da laparoscopia, procedimento este ao qual a senhora aceito previamente a realizar para esclarecer o seu diagnóstico ou para esterilização tubária.
 13. Os pesquisadores se comprometem a utilizar o material desta pesquisa apenas para a finalidade a que se destina. O material ficará armazenado no Laboratório da Universidade de Cornell e, caso no futuro surja interesse na realização de novas pesquisas, uma nova proposta será enviada para a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa. Se essa nova proposta de pesquisa for aprovada pelo Comitê a senhora será novamente consultada se deseja ou não participar da mesma. Caso decida não aceitar continuará a ser atendida da mesma maneira no Hospital das Clínicas, sem nenhum prejuízo para o seu atendimento.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Infecção por *Chlamydia trachomatis*, obstrução tubária e polimorfismo genético no condon 54 do gen que codifica para lecitina ligadora de manose(MBL) em mulheres brasileiras.”

Eu discuti com a Dra. Iara Moreno Linhares e com o Dr Sergio Conti Ribeiro sobre a minha decisão

em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. **Fui informada de que posso entrar em contato com os pesquisadores pelo telefone: 3069-7621.**

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo D-Questionário

"Infecção por *Chlamydia trachomatis*, obstrução tubária e polimorfismo genético no codon 54 do gen que codifica para lecitina ligadora de manose (MBL) em mulheres brasileiras".

QUESTIONÁRIO

Data _____ Entrevistador _____

1. Nome _____

2. Endereço e telefone _____

3. Raça _____

4. Estado civil / marital _____

5. Profissão _____

6. Queixa e duração (se presentes) _____

7. Sintomas (se presentes) _____

corrimento _____ dor pélvica _____ disúria _____

dispareunia superfície _____ dispareunia profundidade _____

prurido genital _____ ardor _____ queimação _____

8. Antecedentes sexuais e obstétricos

idade primeira relação _____ número total parceiros _____

número parceiros últimos 6 meses _____ libido _____

orgasmo _____ sexo oral receptivo _____ sexo anal receptivo _____

numero gestações _____ partos _____ abortamentos _____

prematurados _____ natimortos _____

9. Ciclos menstruais

regulares _____ irregulares _____ cólicas _____

quantidade normal _____ abundantes _____

10. Método contraceptivo

atual _____ anterior _____

11. Episódio de infecções genitais anteriores

sim _____ não _____

tratamento _____ não _____

tratamento parceiro sim _____ não _____

12. Cirurgias anteriores _____

13. Esterilidade (se presente)

causa _____ parceiro _____

tratamentos anteriores _____

Observações :

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- 1 Linhares IM, Witkin SS. Immunopathogenic consequences of *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15(5):467-73.
- 2 Seadi CF, Oravec R, von Poser B, Cantarelli VV, Rossetti ML. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38(2):125-33.
- 3 Braxton J, Davis D, Flagg E, Grey J, Grier LZ, Harvey A, et al. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2016*. Division of STD Prevention September 2017. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2017.
- 4 Torrone E, Papp J, Weinstock H; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of *Chlamydia trachomatis* genital infection among persons aged 14-39 years - United States, 2007-2012. *MMWR - Morb Mortal Wkly Rept*. 2014;63(38):834-8.
- 5 Robial R, Longatto Filho A, Roteli-Martins CM, Silveira MF, Stauffert D, Ribeiro GG, Linhares IM, Tacla M, Zonta MA, Baracat EC. Frequency of *Chlamydia trachomatis* infection in cervical intraepithelial lesions and the status of cytological p16/Ki-67 dual-staining. *Infect Agent Cancer*. 2017;12:3.
- 6 Miranda AE, Szwarcwald CL, Peres RL, Page-Shafer K. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis*. 2004;31(9):542-6.

-
- 7 Rodrigues MM, Fernandes PA, Haddad JP, Paiva MC, Souza MC, Andrade TC, Fernandes AP. Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. *J Obstet Gynaecol*. 2011;31(3):237-41.
- 8 Luppi CG, Oliveira RLS, Veras MA, Lippman SA, Jones H, Jesus CH, Pinho AA, Ribeiro MC, Caiaffa-Filho H. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. *Rev Bras Epidemiol*. 2011;14(3):467-77.
- 9 Araújo R. Estudo da infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em adolescentes e jovens do sexo feminino no Distrito Sanitário Leste do Município de Goiânia: prevalência e fatores de risco. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002;24(7):492.
- 10 Brunham RC, Pourbohloul B, Mak S, White R, Rekart ML. The unexpected impact of a *Chlamydia trachomatis* infection control program on susceptibility to reinfection. *J Infect Dis*. 2005;192(10):1836-44.
- 11 Gorwitz RJ, Wiesenfeld HC, Chen PL, Hammond KR, Sereday KA, Haggerty CL, Johnson RE, Papp JR, Kissin DM, Henning TC, Hook EW 3rd, Steinkampf MP, Markowitz LE, Geisler WM. Population-attributable fraction of tubal factor infertility associated with chlamydia. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(3):336.e1-336.e16.
- 12 Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M. Genital *Chlamydia trachomatis*: an update. *Indian J Med Res*. 2013;138(3):303-16.
- 13 Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, Papp JR, Black CM, Unger ER. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol*. 2005;162(7):668-75.

-
- 14 Steiner AZ, Diamond MP, Legro RS, Schlaff WD, Barnhart KT, Casson PR, Christman GM, Alvero R, Hansen KR, Geisler WM, Thomas T, Santoro N, Zhang H, Eisenberg E; Reproductive Medicine Network. *Chlamydia trachomatis* immunoglobulin G3 seropositivity is a predictor of reproductive outcomes in infertile women with patent fallopian tubes. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1522-6.
- 15 Coremans L, de Clerck F. Fitz-Hugh-Curtis syndrome associated with tuberculous salpingitis and peritonitis: a case presentation and review of literature. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):42.
- 16 Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect*. 2002;78(2):90-2.
- 17 Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Gotz HM, Dees J, Thio HB, Thomeer MGJ, den Hollander JC, Neumann MH, van der Meijden WL. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of *Chlamydia trachomatis* serovar L-2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clin Infect Dis*. 2004;39(7):996-1003.
- 18 McGregor JA, French JI. Chlamydia-trachomatis infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(6 Pt 2):1782-9.
- 19 Hillis SD, Wasserheit JN. Screening for chlamydia - A key to the prevention of pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1996;334(21):1399-401.
- 20 Eggert-Kruse W, Scholz S, Kirschfink M, Strowitzki T. Recurrent miscarriages, innate immunity, and autoimmune reaction to chlamydial 60-kDa heat shock protein-is there an association? *Fertil Steril*. 2014;101(6):1675-80.

-
- 21 Rours G, Duijts L, Moll HA, Arends LR, de Groot R, Jaddoe VW, Hofman A, Steegers EA, Mackenbach JP, Ott A, Willemse HF, van der Zwaan EA, Verkooijen RP, Verbrugh HA. *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy associated with preterm delivery: a population-based prospective cohort study. *Eur J Epidemiol.* 2011; 26(6):493-502.
- 22 Darville T. *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005;16(4):235-44.
- 23 Schachter J, Grossman M, Sweet RL, Holt J, Jordan C, Bishop E. Prospective study of perinatal transmission of *Chlamydia-trachomatis*. *JAMA.* 1986;255(24):3374-7.
- 24 Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of Chlamydia infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(2):149-61.
- 25 Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia celular e molecular.* 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
- 26 Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiologia médica.* 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- 27 Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2 Suppl 2):S24-32.
- 28 Sziller I, Babula O, Ujhazy A, Nagy B, Hupuczi P, Papp Z, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Chlamydia trachomatis infection, Fallopian tube damage and a mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1861-5.

-
- 29 Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007;21(3):347-54.
- 30 Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, Padavattan N, Ismail N, Moodley A, Sabatini ME, Ghebremichael MS, Nusbaum C, Huttenhower C, Virgin HW, Ndung'u T, Dong KL, Walker BD, Fichorova RN, Kwon DS. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*. 2015;42(5): 965-76.
- 31 Martins N, Campaner A, Parellada C, Ribalta J. *Patologia do trato genital inferior*. diagnóstico e tratamento. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2014.
- 32 Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2003;37(11):1496-505.
- 33 Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P, Ledger WJ. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*. 2007;44(4):554-7.
- 34 Thiel S, Frederiksen PD, Jensenius JC. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol*. 2006;43(1-2):86-96.
- 35 Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291-5.
- 36 Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? the example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
- 37 Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7. ed. São Paulo: Artmed; 2010.

-
- 38 Muraille E, Goriely S. The nonspecific face of adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2017;48:38-43.
- 39 Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-S23.
- 40 Paul WE. Bridging innate and adaptive immunity. *Cell*. 2011;147(6):1212-15.
- 41 O'Connor C, Nichol A. Inflammation, immunity and allergy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 2015; 16: 328-33.
- 42 McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017;127(1):5-13.
- 43 Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(10):971-4.
- 44 Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S33-S40.
- 45 Kahlow BS, Nery RA, Skare TL, Ribas C, Ramos GP, Petisco RD. On vascular stenosis, restenosis and mannose binding lectin. *ABCD - Arq Bras Cir Dig*. 2016;29(1):57-9.
- 46 Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun*. 2000;68(2):688-93.
- 47 Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev*. 2009;230(1):9-21.

-
- 48 Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003;40(7):423-9.
- 49 Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 2006;7(2):85-94.
- 50 Nedovic B, Posteraro B, Leoncini E, Ruggeri A, Amore R, Sanguinetti M, Ricciardi W, Boccia S. Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism and vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:738298.
- 51 Klein NJ. Mannose-binding lectin: do we need it? *Mol Immunol.* 2005;42(8):919-24.
- 52 Babula O, Lazdane G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis.* 2003;37(5):733-7.
- 53 Wojitani M, de Aguiar LM, Baracat EC, Linhares IM. Association between mannose-binding lectin and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and recurrent vulvovaginal candidiasis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(1):149-53.
- 54 Babula O, Danielsson I, Sjoberg I, Ledger WJ, Witkin SS. Altered distribution of mannose-binding lectin alleles at exon I codon 54 in women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(3):762-6.
- 55 Fischer LD, van Belle G. *Bioestatistics - a methodology for health sciences.* New York: John Wiley & Sons; 1993.

-
- 56 Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004;16(3):221-9.
- 57 Exacoustos C, Zupi E, Szabolcs B, Amoroso C, Di Giovanni A, Romanini ME, Arduni D. Contrast-tuned imaging and second-generation contrast agent SonoVue: a new ultrasound approach to evaluation of tubal patency. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16(4):437-44.
- 58 Perquin DAM, Beersma MFC, de Craen AJM, Helmerhorst FM. The value of Chlamydia trachomatis-specific IgG antibody testing and hysterosalpingography for predicting tubal pathology and occurrence of pregnancy. *Fertil Steril*. 2007;88(1):224-6.
- 59 Mardh PA. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17(1):49-52.
- 60 Baracat E, Soares Jr J. Conduitas em Ginecologia baseada em Evidências: Clínica Ginecológica: Hospital das Clínicas - FMUSP. São Paulo: Atheneu; 2016.
- 61 Debattista J, Timms P, Allan J, Allan J. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Fertil Steril*. 2003;79(6):1273-87.
- 62 Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;216(1):1-9.
- 63 Manavi K. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20(6):941-51.
- 64 Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Breser ML, Sanchez LR, Cuffini C, Rivero VE. *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: An update. *J Reprod Immunol*. 2013;100(1):37-53.

-
- 65 Bebear C, de Barbeyrac B. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(1):4-10.
- 66 Laisk T, Peters M, Saare M, Haller-Kikkatalo K, Karro H, Salumets A. Association of CCR5, TLR2, TLR4 and MBL genetic variations with genital tract infections and tubal factor infertility. *J Reprod Immunol.* 2010;87(1-2):74-81.
- 67 Swanson AF, Ezekowitz RA, Lee A, Kuo CC. Human mannose-binding protein inhibits infection of HeLa cells by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1998;66(4):1607-12.
- 68 Crow JF. Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics.* 1999;152(3):821-5.