RENATA ROBIAL

**Frequência de *Chlamydia trachomatis* e sua associação com
a expressão de p16/Ki-67 em mulheres com lesões
intraepiteliais cervicais**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada
Baracat

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Robial, Renata

Frequência de *Chlamydia trachomatis* e sua associação com a expressão de p16/Ki-67 em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais / Renata Robial. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.*Chlamydia trachomatis* 2.Prevalência 3.Lesões intraepiteliais escamosas cervicais 4.Infecções por papillomavirus 5.Genes p16 6.Inibidor p16 de quinase ciclina-dependente 7.Antígeno Ki-67

USP/FM/DBD-466/15

Ao meu marido, Felipe Cortizas Ré Martins pelo amor, apoio e paciência.

Ao meu filho, Luis Felipe razão do meu viver.

*Aos meus familiares pelo apoio e ajuda constantes durante todos os
momentos deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma me ajudaram e contribuíram para esta dissertação de mestrado, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Obstetrícia e Ginecologia pela oportunidade e aos professores deste PPG pelos ensinamentos.

Ao Professor Doutor Edmund Chada Baracat por ter acreditado neste trabalho, pelo indispensável apoio e ensinamento, pela orientação nesta caminhada.

Ao Professor Doutor Adhemar Longatto Filho, pelo incentivo, colaboração, orientação e dedicação em todos os momentos.

À querida Professora Doutora Cecília Roteli Martins, pela sua grande participação neste estudo, dedicação, apoio e pelos momentos de alegria e companheirismo.

À Professora Doutora Iara Moreno Linhares pela grande ajuda e orientação realizada com uma delicadeza incrível.

À Professora Doutora Maricy Tacla pelos conselhos e colaboração constantes nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Corintio Mariani Neto, Diretor técnico de Departamento do HMLMB, pelo incentivo e permissão para a realização deste estudo no HMLMB.

Aos amigos do HMLMB Prof. Dra Cristina H. Rama, Dra Angélica C. Rodrigues, Dra Iara Baldacini, Joana D'Arc Marcellos, Janice Olivia Galvani, Denise A. M. Souza, Olivia dos Anjos Ros pela ajuda na coleta das amostras deste estudo.

Ao técnico de imunohistoquímica Guilherme Gomes Ribeiro do Hospital do Câncer de Barretos Fundação PIO XII pela contribuição na realização deste estudo.

À Dulce Stauffert e a Prof. Dra. Mariangela Freitas Silveira e a Universidade Federal de Pelotas pela gentil realização da pesquisa de Chlamydia trachomatis .

Aos amigos Prof. Dr. Marcos Zonta, Priscila H. Oliveira, Ilana di Fiore G. Palermo do Laboratório In Cito, São Paulo pela leitura das citologias em base líquida.

À querida Dra Noely Paula Cristina Lorenzi por toda ajuda durante essa jornada.

Também meu sincero agradecimento às mulheres que participaram deste estudo.

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. Serviço 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	2
1.2 Epidemiologia	5
1.3 Imunologia da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i>	6
1.4 <i>Chlamydia trachomatis</i> e carcinoma de colo uterino.....	10
1.5 Patogênese do carcinoma cervical	12
1.6 O papel da proteína p16	13
1.7 Proteína Ki-67	14
1.8 Prevenção do câncer cervical: o papel das proteínas p16 e Ki-67	14
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MÉTODOS	22
3.1 População do estudo	22
3.1.1 Critérios de inclusão	22
3.1.2 Critérios de exclusão	22
3.1.3 Tamanho da amostra	22
3.2 Descrição da casuística	23
3.3 Citologia.....	24
3.4 Colposcopia	25
3.5 Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
3.6 Imunocitoquímica.....	26
3.7 Aspectos éticos.....	27
3.8 Método estatístico	27

3.9 Fluxograma	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Frequência de <i>Chlamydia trachomatis</i>	30
4.2 <i>Chlamydia trachomatis</i> em relação ao p16/Ki-67	30
4.3 <i>Chlamydia trachomatis</i> em relação às variáveis demográficas.....	31
4.4 <i>Chlamydia trachomatis</i> em relação aos antecedentes sexuais e obstétricos	32
4.5 Regressão logística múltipla em relação a positividade de <i>Chlamydia trachomatis</i>	33
4.6 Associação entre os resultados da citologia e a positividade para <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
4.7 Associação entre os resultados anatomopatológicos de biópsias dirigidas pela colposcopia e a positividade para <i>Chlamydia trachomatis</i>	35
4.8 Associação entre a positividade da expressão das proteínas p16/Ki- 67 em relação aos diagnósticos de lesões intraepiteliais cervicais.....	36
4.9 Associação entre os resultados anormais de citologia de base líquida e a expressão das proteínas p16/Ki-67 em relação aos resultados anatomopatológicos	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	46
7 ANEXOS	49
7.1 Anexo A – Questionário.....	49
7.2 Anexo B – Estudo Imunocitoquímico	51
7.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	60
7.4 Anexo D – Cadastro de Protocolo de Pesquisa	62
7.5 Anexo E – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	66
7.6 Anexo F – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros	68
9 REFERÊNCIAS	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGC	Atipia das células glandulares
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ASCH	Atipia de significado indeterminado, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau
ASCUS	Atipia de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica
Ca	Carcinoma de células escamosas
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CE	Corpúsculos elementares
CR	Corpúsculos reticulares
Ct	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
HBD2	B-defensina 2 humana
HPV	Papilomavírus humano
HSPs	Proteínas de choque térmico
IL	Interleucina
INF-gama	Interferon-gama
LIEAG	Lesão intraepitelial escamos de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LPS	Lipopolissacarídico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
NIC1	Neoplasia intraepitelial cervical grau 1
NIC2	Neoplasia intraepitelial cervical grau 2
NIC3	Neoplasia intraepitelial cervical grau 3

NK	<i>Natural killer</i>
NOD-like	Receptores intracelulares nucleotídeos ligados à oligomerização
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratios</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGN	Peptidoglicanos
pRB	Proteína do retinoblastoma
SLPI	Inibidor da protease de leucócito secretório
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Receptores <i>Tool-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida da <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
-----------------	---	---

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição dos resultados anatomopatológicos segundo a presença de <i>Chlamydia trachomatis</i>	35
------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das mulheres segundo a detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> em amostras cervicais preservadas em meio líquido	30
Tabela 2	Associação de <i>Chlamydia trachomatis</i> com os resultados de p16/Ki-67	30
Tabela 3	Associação entre a positividade para <i>Chlamydia trachomatis</i> e as variáveis demográficas	31
Tabela 4	Associação entre a positividade para <i>Chlamydia trachomatis</i> e os antecedentes sexuais e obstétricos	32
Tabela 5	Regressão logística múltipla em relação a positividade da <i>Chlamydia trachomatis</i>	33
Tabela 6	Associação entre os resultados de citologia e a presença da <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
Tabela 7	Associação da positividade da expressão de p16/Ki-67 em relação ao diagnóstico citológico de baixo e alto grau	36
Tabela 8	Associação da expressão de p16/Ki-67 com os resultados anatomopatológicos das biópsias dirigidas pela colposcopia	37

RESUMO

Robial R. *Frequência de Chlamydia trachomatis e sua associação com a expressão de p16/Ki-67 em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Objetivos: Verificar a frequência de *Chlamydia trachomatis* e a sua associação com a expressão de p16/Ki-67 em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais. Analisar a associação entre a positividade para *Chlamydia trachomatis* e variáveis demográficas selecionadas, antecedentes sexuais e obstétricos, resultados anormais citológicos e anatomopatológicos. Também verificar a associação entre a expressão da dupla coloração para p16/Ki-67 com os resultados citológicos e anatomopatológicos. **Métodos:** Estudo de corte transversal em 1481 mulheres de 18 a 64 anos, participantes de projeto de rastreamento para câncer cervical realizado em São Paulo. As citologias foram coletadas em meio líquido e no líquido residual foi pesquisada a presença do DNA da *Chlamydia trachomatis*. Nos resultados de citologia anormal foi feita a pesquisa da expressão das proteínas p16/Ki-67. A análise estatística foi realizada usando-se os testes qui-quadrado e da razão de verossimilhanças. Foram estimados os valores de *odds ratios* (OR) com os respectivos intervalos com 95% de confiança. **Resultados:** A frequência de detecção da *Chlamydia trachomatis* foi 15,6%. Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de *Chlamydia trachomatis* e a expressão de p16/Ki-67 [OR=1,35 (0,5-3,4)]. A idade e o número de parceiros sexuais apresentou associação significativa com a presença de *Chlamydia trachomatis* [OR= 2,01 (1,1-3,6) e 4,14 (1,7-10,3)]. Não foi encontrada associação significativa entre citologia alterada e a positividade para *Chlamydia trachomatis* [1,21 (0,46-3,2)]. Não foi observada associação significativa entre os resultados anatomopatológicos e a presença de *Chlamydia trachomatis* ($p = 0,112$). A expressão do p16/Ki-67 mostrou associação estatisticamente significativa com lesões intraepiteliais cervicais de alto grau tanto nos resultados citológicos quanto anatomopatológicos. **Conclusões:** A frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* na amostra estudada foi de 15,6%. A associação da *Chlamydia trachomatis* com a dupla coloração para p16/Ki-67 nas citologias anormais não foi significativa, não sendo possível estabelecer uma associação clara entre a presença de *Chlamydia trachomatis* e a persistência da infecção por HPV oncogênico detectada por este marcador. Dentre as variáveis demográficas pesquisadas, a faixa etária apresentou associação estatisticamente significativa com a presença do DNA da *Chlamydia trachomatis*; mulheres com idade entre 35 e 45 apresentaram a maior frequência da infecção; entretanto, mesmo as outras faixas etárias mostraram uma alta frequência da presença desse patógeno; foi observada

maior frequência da infecção entre as mulheres com mais de 10 parceiros sexuais, quando comparadas com as com menor número de parceiros durante a vida e essa associação foi estatisticamente significativa; não foi demonstrada associação significativa entre os resultados anormais da citologia com a positividade para a presença do DNA da *Chlamydia trachomatis*. Não foi encontrada associação significativa entre os resultados anatomopatológicos dirigidas pela colposcopia com a positividade da infecção pela bactéria. A positividade da dupla coloração para p16/Ki-67 foi significativamente maior nas lesões intraepiteliais cervicais de alto grau. Foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre a expressão do p16/Ki-67 com os resultados anatomopatológicos das biopsias dirigidas pela colposcopia.

Descritores: *Chlamydia trachomatis*; Prevalência; Lesões intraepiteliais escamosas cervicais; Infecções por papillomavirus; Gene p16; Inibidor de quinase ciclina-dependente; Antígeno Ki-67.

ABSTRACT

Robial R. Prevalence and Association of *Chlamydia trachomatis* with the expression of p16/Ki-67 in women with cervical intraepithelial lesions [Dissertation]. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Objective: To verify the frequency of *Chlamydia trachomatis* and its association with the expression of p16/Ki-67 on women with cervical intraepithelial lesions. To analyze the association between *Chlamydia trachomatis* presence and the selected demographic variables such as sexual and obstetric history, abnormal cytology and histopathology, as well as analyzing any association between the expression of dual staining for p16/Ki-67 with cytological and histopathological results. **Methods:** Cross-sectional study on 1481 women with ages between 18 and 64 years, who were enrolled in a screening project for cervical cancer held in São Paulo. The cytology was collected in liquid based medium and the residual liquid was submitted for examination to find the presence of *Chlamydia trachomatis* DNA. The expression of protein p16/Ki-67 was performed in the abnormal cytology results. Statistical analysis was performed using chi-square tests and likelihood ratio. The values of the odds ratios (OR) with respective intervals of 95% confidence were estimated. **Results:** The frequency of detection of *Chlamydia trachomatis* was 15.6%. There was no statistical significant association between the presence of *Chlamydia trachomatis* and the expression of p16/Ki-67 [OR = 1.35 (0.5 to 3.4)]. Both the age and number of sexual partners presented a significant association in presence of *Chlamydia trachomatis* [OR = 2.01 (1.1 to 3.6) and 4.14 (1.7 to 10.3)]. There was no significant association between abnormal cytology and positivity for *Chlamydia trachomatis* [1.21 (0.46 to 3.2)]. No significant association was found between histopathological results and presence of *Chlamydia trachomatis* ($p= 0.112$). The expression of p16/Ki-67 showed a significant statistical association with high grade intraepithelial lesions in both cytological and histopathological results. **Conclusions:** The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection on the sample studied was 15.6%. The association of *Chlamydia trachomatis* with dual staining for p16/Ki-67 in abnormal cytology was not significant, therefore, it is not possible to establish a clear association between the presence of *Chlamydia trachomatis* and the persistence of oncogenic HPV infection detected by this marker. Among the demographic variables, the age range showed statistically significant association with the presence of *Chlamydia trachomatis*; women aged between 35 – 45 years showed the highest rate of infection, nevertheless the other age ranges showed a high frequency of the presence of this pathogen;

It has been observed a higher number of infected women who had more than 10 sexual partners compared to woman who had less partners throughout life and this association was statistically significant; No significant association was found between abnormal cytology with positivity for the presence of *Chlamydia trachomatis* DNA; There was no significant association between pathological results directed by colposcopy with the positivity of *Chlamydia trachomatis*; The positivity of the double staining for p16/Ki-67 was significantly higher in the cervical high-grade intraepithelial lesions; Statistical significant association was demonstrated between the expression of p16/Ki-67 with histopathological results of biopsy directed by colposcopy.

Descriptors: *Chlamydia trachomatis*; Prevalence; Squamous intraepithelial lesions of the cervix; Papillomavirus infection; gene p16; Cyclin-dependent kinase inhibitor p16; Ki-67antigen.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* (Ct) é uma bactéria Gram negativa, esférica ou ovalada e, diferente de outras bactérias, tem ciclo de vida intracelular obrigatório. Possui características semelhantes às virais, como tamanho (0,2-1,3 microns), dependência da célula hospedeira para produção de energia, ciclo de vida intracelular, formação de inclusões citoplasmáticas, além de não crescer em meio de cultura sintético. Apresenta tropismo pelos epitélios colunares presentes na cérvix uterina, na uretra, no reto e, em locais distantes do trato genital, como pulmões e olhos^{1,2,3}.

Segundo a classificação filogenética, a *Chlamydia trachomatis* pertence à ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, gênero *Chlamydia* e espécie *trachomatis*. Já foram descritos 19 sorotipos diferentes dessa bactéria. Os sorotipos que vão de D até K (incluindo Da, Ga, Ia) estão relacionados a infecções urogenitais; os sorotipos A, B, Ba e C causam o tracoma ocular e os sorotipos L₁, L₂ e L₃ o linfogranuloma venéreo¹.

1.1 Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*

A *Chlamydia trachomatis* apresenta ciclo bifásico de reprodução, representado pelos corpúsculos elementares (CE) e pelos corpúsculos reticulares (CR). Os CE representam a forma infecciosa, metabolicamente inertes e responsáveis pela invasão das células epiteliais. Os CE estão presentes no meio extracelular. Os CR são maiores em tamanho e mais ricos em RNA, considerados como a forma metabólica ativa, replicativa e não infecciosa da bactéria, sendo responsáveis pela cronicidade e persistência da infecção⁴.

O CE se acopla a uma superfície da célula epitelial e é incorporado ao fagossoma (vacúolo de inclusão), que migra para a região distal do aparelho de Golgi, permanecendo, assim, protegido do ataque dos lisossomos. Dentro dos vacúolos de inclusão os CE iniciam a diferenciação na forma metabolicamente ativa, que são os corpúsculos reticulares. Esse processo leva, em média, de 2 a 6 horas. A partir daí os corpúsculos reticulares iniciam a replicação por divisão binária, usando os metabólitos da célula hospedeira, aumentando o volume do fagossoma. O pico de replicação ocorre em, aproximadamente, 18 a 24 horas⁴. A seguir, os CR retornam à forma de CE, gerando vacúolos dentro do citoplasma. Quando estes vacúolos substituem quase todo o citoplasma da célula hospedeira, ocorre a lise desta, com a liberação de CE infectantes para o meio extracelular, dando início assim a um novo ciclo de infecção. Este é um dos mecanismos mais diferenciados de replicação que existe na natureza, facilitando o estabelecimento da cronicidade da infecção. Com este mecanismo de replicação intracelular, existe troca de material da bactéria com a célula infectada, criando dificuldades para o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro⁵ (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida da *Chlamydia trachomatis*⁵

Para garantir a vida no meio intracelular e completar seu ciclo de vida, a *Chlamydia trachomatis* possui a habilidade de inibir a apoptose nas células infectadas. O mecanismo exato de como isso ocorre ainda não é completamente entendido, mas envolve a produção pela bactéria de fatores que fazem uma regulação negativa na cascata de eventos que culminam na apoptose⁶.

1.2 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram mais de cem milhões de novos casos de infecções por *Chlamydia trachomatis* anualmente em todo o mundo; com aumento de 4,1% desde a última avaliação global realizada em 2006⁷. Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), a *Chlamydia trachomatis* é a bactéria sexualmente transmissível mais frequente nos Estados Unidos, com mais de 1 milhão de infecções notificadas por ano. O rastreamento anual é recomendado pela força tarefa dos Estados Unidos em mulheres sexualmente ativas até 25 anos de idade e em mulheres acima de 25 anos que estiverem sob o risco de infecção (múltiplos parceiros sexuais, parceiro com doenças transmitidas sexualmente ou novos parceiros). Em recente registro verificou-se que a prevalência entre pessoas de 14 até 39 anos foi de 1,7%. Já em mulheres sexualmente ativas com idade entre 14 e 24 anos, encontrou-se uma prevalência geral de 4,7%, sendo que somente entre as mulheres da raça negra a prevalência de infecção por esta bactéria foi de 13,5%⁸.

No Brasil a *Chlamydia trachomatis* não é doença de notificação compulsória e as taxas de prevalência da infecção genital variam de acordo com a região do país em que os estudos foram efetuados; além disso, as técnicas empregadas para pesquisa, muitas vezes, foram diferentes. Também é importante ressaltar que, na grande maioria dos estudos, as mulheres foram selecionadas de grupos específicos, como mulheres provenientes de ambulatório de planejamento familiar, de infertilidade e clínicas de pré-natal^{9,10,11,12}.

Estudo retrospectivo realizado em serviço público de Goiás com 340 mulheres com idade entre 20 e 47 anos, procedentes de ambulatório de reprodução humana, mostrou 10,9% de prevalência pela pesquisa de DNA de *Chlamydia trachomatis* em amostra de urina. Outro estudo realizado também em um serviço público referência em reprodução assistida, porém no Estado de São Paulo, encontrou prevalência de 1,1% em 176 mulheres usando método de captura de híbridos em material de *swab* endocervical^{10,11}.

No Paraná, estudo em mulheres com idade entre 16 e 23 anos, reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostra de urina, registrou prevalência de 10,7%¹². No mesmo estado, outra pesquisa avaliou por PCR a presença de *Chlamydia trachomatis* nas citologias cervicais de 622 mulheres com idade entre 15 e 83 anos, encontrando positividade de 12,7%¹³.

Na cidade de São Paulo foi realizado estudo em 818 mulheres com idade entre 18 e 40 anos provenientes da atenção primária à saúde; a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* por PCR usando a autocoleta de material vaginal demonstrou a prevalência de 8,4%¹⁴.

Em Manaus, a prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres de 14 a 63 anos participantes de rastreamento para câncer de colo uterino, foi de 20,7% com pesquisa no material endocervical por PCR. Em 80% dos casos com exame positivo a idade era inferior a 23 anos¹⁵.

No Rio Grande do Sul, estudo com amostra endocervical de mulheres com idade igual ou superior a 14 anos, submetidas a rastreamento de câncer de colo uterino, revelou 11% de prevalência para *Chlamydia trachomatis* por pesquisa de DNA¹⁶.

Recentemente, projeto realizado no estado do Rio Grande do Norte, com 1134 mulheres sexualmente ativas de 14 a 64 anos de idade, que também estavam envolvidas em um projeto de rastreamento para câncer de colo uterino, demonstrou a prevalência de 10,9% pela pesquisa de DNA com PCR¹⁷.

Em um único estudo multicêntrico feito no Brasil, em seis cidades com 3.303 gestantes, a prevalência de *Chlamydia trachomatis* por captura híbrida em material cervical foi de 9,4%¹⁸.

1.3 Imunologia da infecção por *Chlamydia trachomatis*

A *Chlamydia trachomatis* é um microrganismo que tem capacidade de persistir no hospedeiro mesmo após a ativação da resposta imune. A ativação dessa resposta envolve a interação do hospedeiro com diversos

antígenos da célula bacteriana. Existem dois antígenos relacionados ao diagnóstico e à patogênese da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: o antígeno lipopolissacarídico (LPS) e o antígeno da *major outer membrane protein* (MOMP). O LPS é compartilhado por todas as espécies de microrganismo e é mais frequentemente encontrado no corpúsculo reticular, sendo responsável pela mediação fisiopatogênica da bactéria. Por sua vez, os antígenos da MOMP são espécie-específicos, sendo utilizados para a sorotipagem e diferenciação entre os vários sorotipos. Os anticorpos produzidos contra a MOMP estão associados à resposta imune protetora^{19,20}.

Os lipopolissacarídeos da bactéria apresentam baixo potencial para ativar o sistema imune, muito inferior, por exemplo, ao da *Salmonella* (100 vezes menos potente). O lento desenvolvimento da imunidade pelo hospedeiro pode ser explicado tanto por esse baixo potencial de ativar o sistema imune quanto pela capacidade da *Chlamydia trachomatis* fazer uma regulação negativa do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, induzidos pelo *interferon* gama²⁰.

Na ativação da resposta imune os sinais derivados dos receptores Tool-like (TLR), proteínas transmembrana componentes do sistema imune inato, estão implicados na patogênese da infecção. A *Chlamydia trachomatis* possui vários componentes da parede celular e da membrana externa que podem servir como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos pelos TLRs. Os TLRs 2 e 4 são os mais bem estudados com relação à resposta imunológico inata à *Chlamydia trachomatis*. O TLR2 está envolvido no reconhecimento dos componentes dos peptidoglicanos (PGN) da bactéria; já os componentes dos lipopolissacarídeos (LPS) e as proteínas de choque térmico (HSPs) são ligantes para o receptor TLR4. Tanto o TLR2 quanto o TLR4 são expressos no trato genital feminino. O TLR2 é mais expresso nas tubas uterinas e na cérvix, enquanto o TLR4 nas tubas uterinas e no endométrio, e fracamente na ectocérvice. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes funções do trato genital, como proteção contra doenças sexualmente

transmissíveis, sem alterar a flora vaginal comensal e a tolerância tanto ao sêmen quanto à implantação embrionária. A ligação dos peptidoglicanos, lipopolissacarídeos e proteínas de choque térmico aos TLRs ativam fagócitos e também estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6. Quando a bactéria entra nas células, são os receptores intracelulares nucleotídeos ligados à oligomerização (NOD-like) os responsáveis por reconhecer a bactéria intracelular pelo LPS e peptideoglicanos, iniciando a resposta imunológica^{21,22}.

No trato genital feminino, a defesa contra a *Chlamydia trachomatis* envolve a barreira mucosa das células epiteliais e a imunidade (humoral e celular). Os hormônios sexuais estradiol e progesterona modulam a imunidade inata e adaptativa contra a *Chlamydia trachomatis* pela regulação de células imunes e pela alteração do muco cervical. Na imunidade inata, a barreira epitelial é pouco efetiva na proteção contra a *Chlamydia trachomatis*, já que esta possui mecanismos de evasão a essa barreira. O muco cervical contém uma variedade de fatores antimicrobianos, além da microbiota endógena, que contribui para a regulação do pH na proteção contra patógenos. As células da imunidade inata produzem fatores de defesa como inibidor da protease de leucócito secretório (SLPI), B-defensina 2 humana (HBD2), lisozima, lactoferrina entre outros. As células imunes, como macrófago, neutrófilos, *natural killer* (NK), produzem antimicrobianos solúveis, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no combate à infecção bacteriana. O recrutamento e a ativação da imunidade adaptativa (células B e T) são estimulados pelos fatores antimicrobianos solúveis das células epiteliais, dendríticas e macrófagos. Na imunidade humoral, os anticorpos podem prevenir a infecção pela *Chlamydia trachomatis*. No trato genital, a imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo mais frequentemente encontrado. Os anticorpos provenientes do plasma (IgG e IgA) inativam os corpos elementares extracelulares. Na imunidade celular, por outro lado, os linfócitos T CD4 produzem interferon-gama (INF-gama), que está relacionado com a inibição da replicação intracelular da *Chlamydia trachomatis*. Os linfócitos CD8 induzem a apoptose nas células infectadas²³.

Em condições usuais, são necessários meses para que ocorra o desenvolvimento da imunidade contra a infecção por *Chlamydia trachomatis*, provavelmente devido à baixa virulência da bactéria, assim como por suas propriedades imunossupressoras, capacidade de sobreviver fora das células e habilidade de persistir no meio intracelular. A resolução espontânea da infecção estudada em 82 mulheres foi de 54% no primeiro ano, 82% no segundo, 91% no terceiro e 95% no quarto ano²⁰.

Existem vários mecanismos propostos para explicar o desenvolvimento da patogenicidade na infecção por *Chlamydia trachomatis*. Estudos em modelos animais e humanos demonstraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias para combater a infecção pela bactéria (TNF alfa, IL-8, IL-1 e GM-CSF) são responsáveis também pelo dano epitelial tubário. A IL-1 está associada à destruição das tubas uterinas; a presença da IL-10 nas infecções cervicais parece estar associada, também, com a infertilidade. As células T do sistema imunológico são as mais importantes defesas contra a *Chlamydia trachomatis*. Mulheres com infecção recorrente apresentam elevados níveis de INF-gama, e esses níveis elevados estão associados à infertilidade. Isso ficou demonstrado em estudo no qual cada novo episódio de doença inflamatória pélvica dobrou o risco de dano nas tubas uterinas: 8% no primeiro episódio; 19,5% no segundo e 40% nos casos com três ou mais infecções²⁰.

Outro modelo descrito na patogênese da infecção por *Chlamydia trachomatis* envolve as proteínas de choque térmico: *heat shock proteins* – HSP que constituem um grupo de chaperonas envolvidas com o correto dobramento das proteínas intracelulares. São encontradas em organismos eucariotas e procariotas. Apresentam um aumento da regulação quando a célula é exposta, por exemplo, a elevação da temperatura, estresse oxidativo ou inflamação. Por outro lado, durante o processo infeccioso, a *Chlamydia trachomatis* também produz HSP, particularmente HSP60, que é altamente imunogênica e possui elevada homologia com a proteína humana. Assim, a persistência da *Chlamydia trachomatis* e a exposição contínua ao antígeno estimulam a resposta celular específica contra a bactéria, ao

mesmo tempo em que desencadeiam uma reação cruzada, levando à resposta autoimune; tais eventos determinariam as sequelas da infecção^{20,24}. Em humanos, altos títulos de anticorpos em resposta a HSP60 estão fortemente associados à doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade⁴.

Estudos recentes demonstram, também, a importância de polimorfismos genéticos do hospedeiro como fatores relevantes na suscetibilidade à infecção. A avaliação das variações genéticas na resposta imune decorrentes do polimorfismo pode trazer consequências imunológicas, com o risco da persistência da infecção. Na resposta imune normal, há um reconhecimento do patógeno pelos TLRs e NODs mas, nas variações genéticas do hospedeiro, esse reconhecimento não é feito de maneira adequada, permitindo, assim, a progressão da infecção^{20,25}.

Quando a infecção cervical por *Chlamydia trachomatis* não é eliminada adequadamente, pode ascender e causar doença inflamatória pélvica e consequente infertilidade. Em mulheres grávidas, a tem sido associada ao risco aumentado de gestação ectópica, abortamento espontâneo, parto prematuro, baixo peso do concepto ao nascimento, rotura prematura das membranas, infecções puerperal e perinatal. Como 70 a 80% das mulheres infectadas permanecem assintomáticas, o rastreamento é fundamental na prevenção de sequelas. Os sintomas, quando presentes, costumam estar associados a dispareunia, sangramento uterino anormal, dor pélvica e disúria².

1.4 *Chlamydia trachomatis* e carcinoma de colo uterino

A *Chlamydia trachomatis* é incluída entre os cofatores que levam à persistência da infecção por papilomavírus humano (HPV) e, por conseguinte, está envolvida no desenvolvimento do carcinoma cervical. Mulheres infectadas por *Chlamydia trachomatis* apresentam maiores alterações citológicas. Isso é explicado pela produção de enzimas que

possuem ação antiapoptótica e facilitam a ação das oncoproteínas em células infectadas pelo HPV de alto risco. A infecção por *Chlamydia trachomatis* parece atuar em sinergismo com o HPV aumentando o risco de carcinoma escamoso. Todavia, essa associação é modesta se for comparada ao forte efeito da infecção por HPV no risco dessa neoplasia^{26,27}.

Elevadas taxas de câncer cervical em certas populações são coincidentes com cervicite endêmica ou epidêmica. A inflamação em resposta a uma infecção crônica leva à produção de oxidantes não específicos que, algumas vezes, podem causar dano no DNA e, potencialmente, levar ao desenvolvimento de câncer. A associação entre inflamação e alguns tipos de câncer sugere que a inflamação pode ser um fator de risco universal para a carcinogênese²⁸.

Existe a hipótese de que a *Chlamydia trachomatis* facilitaria a entrada do HPV e seu acesso à camada basal do epitélio ao induzir uma inflamação crônica, hipertrofia cervical e metaplasia, esta última alvo preferencial do HPV. Esses efeitos biológicos aumentariam o risco de transformação das células cervicais e a persistência da infecção por tipos oncogênicos do vírus. A *Chlamydia trachomatis* e o HPV talvez aumentem a expressão do Ki-67 (marcador de proliferação celular do epitélio cervical) pelas ações mitogênicas geradas pelo HPV e pela ação antiapoptótica relacionada a esses dois agentes infecciosos. A *Chlamydia trachomatis* também aumentaria a expressão proteica dos oncogenes do HPV16 nas lesões de baixo grau, sugerindo que a atividade do vírus pode ser modificada por essa infecção. Além disso, a bactéria modula a resposta imune e inibe a apoptose²⁹.

Tem sido proposto também que a proteína de choque térmico (HSP60) da *Chlamydia trachomatis* interfere na apoptose e na senescência das células, ativando a proliferação celular e aumentando as chances de dano celular em células infectadas pelo HPV oncogênico²⁹.

Adicionalmente, a *Chlamydia trachomatis* poderia estimular a persistência do HPV por meio da diminuição da resposta antigênica das células, assim inibindo a produção de células do sistema imune²⁹.

1.5 Patogênese do carcinoma cervical

Os HPVs oncogênicos expressam precocemente duas proteínas, E6 e E7 no ciclo de vida viral. Os produtos desses dois genes alteram o metabolismo da célula hospedeira favorecendo o desenvolvimento de neoplasias³⁰.

Na carcinogênese o E6 liga-se e degrada a proteína p53, que é supressora de tumor e responsável pela regulação celular promovendo a apoptose quando necessário. A proteína E7 tem efeito semelhante sobre o metabolismo celular ligando-se à proteína do retinoblastoma (pRB) e inibindo a função de supressão tumoral da mesma. Assim, a ação desses oncogenes leva à ruptura do controle do ciclo celular, promovendo a imortalização da célula³¹.

Os graus de expressão do E6 e E7 estão altamente associados com o tipo de lesão cervical. Nas lesões de baixo grau, são expressos em baixos níveis nas células basais e altos níveis no epitélio superficial. Nas lesões de alto grau, eles são expressos em todas as camadas do epitélio. Além disso, nas lesões de baixo grau, o HPV está na forma epissomal, enquanto que nas lesões de alto grau encontra-se integrado ao DNA do hospedeiro, o que aumenta a proliferação celular e a possibilidade de malignização³².

A expressão viral dos oncogenes E6 e E7 diferencia duas fases na evolução da infecção por HPV: a fase transitória e a fase de transformação. A fase transitória, também chamada de produtiva, é caracterizada pelo controle do ciclo celular e baixa expressão dos genes E6 e E7 nas células basais e parabasais do epitélio escamoso. Normalmente, quando iniciam diferenciação e progressão em direção às células intermediárias, as células perdem a capacidade de proliferar interrompendo o ciclo celular. Nesse estado de maturidade senescente os genes do HPV começam a ser expressos em altas taxas e iniciam a replicação viral epissomal dentro do núcleo das células infectadas. Quando as células alcançam a superfície do epitélio, os vírus mudam o padrão da expressão genética para os genes E4 e para os genes tardios L1 e L2, cujos produtos não são encontrados nas

camadas inferiores do epitélio escamoso³³.

A fase de transformação é caracterizada pela superexpressão dos genes E6 e E7 nas camadas basal e parabasal das células escamosas, que escaparam do controle regulatório da proteína E2. Os oncogenes promovem a instabilidade cromossômica, provavelmente permitindo a seleção de clones pré-neoplásicos; induzindo a progressão para carcinoma invasivo. Células exibindo o modo de transformação viral podem, inicialmente, aparecer entre células no modo de expressão produtivo. Portanto, é importante notar que as células na fase de transformação inicial ainda mantêm a capacidade de diferenciação característica das células epiteliais e, também mantêm a replicação viral. Essas células aparecem no exame citológico como lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG). Se as células transformadas expandirem, a lesão poderá aparecer exame citológico como lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG)³³.

1.6 O papel da proteína p16

O p16 é marcador direto da desregulação celular causada pela expressão dos oncogenes do HPV. O alvo das oncoproteínas do E7 são as proteínas da família do retinoblastoma (Rb), proteína fosfonuclear associada a supressão da proliferação celular, estimulando diferenciação, senescência e manutenção da quiescência. O Rb interage com um grupo de proteínas E2F relacionadas a progressão do ciclo celular. A atividade das proteínas E2F é regulada por fosforilação e inativação pelas cininas dependentes de ciclinas (CDK 4/6); as CDK4 e 6 são controladas pelo p16. A superexpressão do p16 (inibidor da CDK4 e 6) é consequência direta da ação do HPV. Quando o E7 é superexpresso ocorre a ruptura da ligação do pRb com E2F, o que leva ao aumento do p16. A função da expressão da proteína p16, portanto, é prevenir a hiperproliferação e a inativação da proteína pRB. Como a pRB também é inibida pela proteína do HPV E7, todas as células transformadas pelo papilomavírus oncogênico tornam-se

incapazes de controlar seu ciclo celular via pRb. Essas células são, usualmente, proliferativas e apresentam superexpressão da p16, que hoje é reconhecida como um marcador da transformação induzida pelo HPV; mais especificamente, indica a atividade da oncoproteína E7^{33, 34}.

1.7 A proteína Ki-67

O Ki-67 é um antígeno nuclear expresso somente em células em divisão durante a fase de mitose do ciclo celular e em G2. Portanto funciona como um marcador de crescimento tumoral³³.

Além disso, a detecção simultânea do marcador de proliferação Ki-67 e do p16 na mesma célula é considerada como sinal específico da transformação neoplásica. Em condições fisiológicas, a coexpressão dessas proteínas não ocorre, já que possuem efeitos opostos. Enquanto o p16 possui atividade antiproliferativa, interrompendo o ciclo celular, o Ki-67 é encontrado apenas em células em divisão. A coloração simultânea da p16 e Ki-67, portanto, pode ser utilizada para identificar a transformação celular nos exames citológicos. Evidências sugerem ainda que é necessário alto nível de expressão do p16 para manter o crescimento neoplásico das células transformadas pelo HPV^{33,34}.

1.8 Prevenção do câncer cervical: o papel das proteínas p16 e Ki-67

O rastreamento do câncer cervical por meio da citologia é capaz de reduzir em até 50% as taxas de mortalidade quando há programas de qualidade e boa cobertura populacional; porém, a sensibilidade da citologia para detectar neoplasia intraepitelial cervical ou câncer invasivo parece ser inferior a 60%³⁵.

O rastreamento para câncer cervical pode ser realizado por meio da citologia convencional em lâmina ou a partir de meio líquido, ou, ainda, pelo

teste de HPV. Revisão sistemática comparou os dois métodos citológicos e não encontrou diferenças estatisticamente significativas na sensibilidade e especificidade entre os mesmos; porém, o rastreamento a cada três anos com citologia em meio líquido mostrou-se economicamente atrativo. Em comparação com a citologia convencional, o uso de citologia em meio líquido com triagem de HPV a cada dois anos representaria uma redução dos custos de rastreamento. O teste de HPV é mais sensível do que a citologia para detectar alterações de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau; porém, é menos específico, principalmente em mulheres jovens^{36,37}.

Nos casos em que o resultado da citologia apresenta alterações menores, o teste de DNA HPV poderá ser utilizado para selecionar as mulheres com maior risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Nas mulheres que apresentam o resultado de atipia de significado indeterminado (ASCUS) na citologia o teste do DNA HPV parece ser mais sensível e específico do que a repetição de uma nova citologia na identificação de lesões como neoplasia intraepitelial cervical 2 ou 3 (NIC2 ou NIC3). Já nos casos em que o resultado da citologia é de lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG), a especificidade do teste de HPV é menor do que a repetição de uma nova citologia³⁸.

O teste de DNA HPV é altamente sensível e proporciona, para os resultados negativos, uma certeza de baixo risco de câncer cervical, permitindo, com segurança, um aumento no intervalo de rastreamento. Entretanto, sua especificidade é limitada, já que a maior parte das infecções por HPV é transitória. Como a infecção por HPV é altamente prevalente em jovens, o teste de HPV não é recomendado para mulheres com menos de 30 anos³⁹.

O entendimento da forma como o HPV contribui para transformação neoplásica das células cervicais possibilitou o uso de biomarcadores, como identificação do p16, adicionando maior eficácia na detecção precoce do câncer cervical. Como algumas células cervicais normais podem apresentar a expressão de p16, é necessária uma avaliação morfológica adicional. Recentemente, foi desenvolvido um kit para detecção das proteínas p16 e

Ki-67, que permite o reconhecimento de células anormais baseado na dupla coloração de tais marcadores na mesma célula, possivelmente, reduzindo a necessidade de interpretação morfológica⁴⁰.

Estudos aplicando o uso do marcador p16 tanto em citologia como em histologia sugerem uma aplicação clínica vantajosa, que poderá ajudar a desvendar melhor a biologia envolvida nas lesões histológicas e citológicas, e otimizar a eficácia dos testes citológicos⁴⁰.

A dupla coloração da citologia com a detecção do p16/Ki-67 tem sido avaliada como biomarcador para rastreamento do câncer cervical na triagem das citologias com resultado de ASCUS e LIEBG para o rastreamento primário, assim como também em triagem nas mulheres com teste de HPV positivo⁴¹.

Em trabalho recente, mulheres com ASCUS com teste de HPV positivo ou lesões citológicas mais severas foram referenciadas para um serviço de colposcopia onde foi realizada pesquisa de p16/Ki-67 e genotipagem do HPV. Os resultados demonstraram o aumento gradativo da positividade da dupla marcação p16/Ki-67 à medida que as lesões citológicas se tornaram mais graves. Assim, para as citologias normais a positividade para dupla marcação p16/Ki-67 foi 19,6%, em presença de ASCUS 40,2%, nas lesões de baixo grau 68,8% e nas lesões de alto grau 95,3%. Quando comparada à genotipagem do HPV, a porcentagem de positividade de p16/Ki-67 foi menor para resultados normais, ASCUS e LIEBG, mas não houve diferença estatisticamente significativa de positividade do HPV nas com ASC-H e LIEAG, quando comparada ao uso do p16/Ki-67, o que indica uma maior especificidade diagnóstica do teste para p16/Ki-67 do que o teste de HPV. O teste p16/Ki-67 foi positivo em 59% das mulheres que participaram do estudo, com sensibilidade de 86% para NIC2 e 93% para NIC3. Esses resultados indicam que o uso da dupla marcação com o p16/Ki-67 pode diminuir o número de mulheres referenciadas desnecessariamente para colposcopia em quase 50%, por detectar os casos mais severos para NIC3⁴².

Outra pesquisa investigou que 27.349 mulheres, demonstrou dupla coloração da citologia para p16/Ki-67 apresentou sensibilidade para NIC2 maior do que a citologia isolada em mulheres de todas as idades, com especificidade similar. O mesmo estudo demonstrou ainda que o teste de DNA HPV em mulheres acima de 30 anos foi mais sensível que a dupla coloração na citologia, porém menos específico. Como já mencionado, em mulheres abaixo de 30 anos, o teste de DNA HPV não é recomendado porque geralmente a infecção é transitória. Nessas mulheres, a dupla coloração pode aumentar a eficiência da citologia³⁹.

Um estudo realizado no México comparou diferentes estratégias de rastreamento do câncer cervical. Os resultados demonstraram que a pesquisa de HPV associada à triagem molecular com p16/Ki-67 evidenciou ser melhor alternativa de rastreamento, por ser a menos onerosa e a mais eficaz⁴³.

A dupla coloração com p16/Ki-67 tem se mostrado eficiente no rastreamento do câncer cervical quando associada a outras ferramentas, apresentando alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico das lesões resultantes das infecções estabelecidas pelo vírus HPV⁴³.

Frente aos dados da literatura que demonstram a importância da infecção por *Chlamydia trachomatis* na saúde reprodutiva da mulher e seu impacto na saúde pública, o presente trabalho propôs-se avaliar a sua frequência, combinando a estratégia de rastrear simultaneamente a infecção por *Chlamydia trachomatis* e as lesões precursoras do câncer cervical, assim como o papel da bactéria na carcinogênese do colo uterino avaliando a persistência da infecção pelo HPV.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* e sua associação com a expressão das proteínas p16/Ki-67 em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a associação entre a positividade para *Chlamydia trachomatis* e variáveis demográficas (faixa etária, escolaridade, estado civil e tabagismo);
- Analisar a associação entre a positividade para *Chlamydia trachomatis* e antecedentes sexuais e obstétricos (idade de início da atividade sexual, número de parceiros durante a vida, número de parceiros no último ano, paridade e antecedente de doenças sexualmente transmissíveis – DST);
- Avaliar a associação entre resultados da citologia e a positividade para *Chlamydia trachomatis*;
- Verificar a associação entre os resultados anatomopatológicos de biópsias dirigidas pela colposcopia e a positividade para *Chlamydia trachomatis*;
- Verificar a associação entre a positividade da expressão das proteínas p16/Ki67 em relação aos diagnósticos de lesões intraepiteliais cervicais;

- Verificar a associação entre resultados anormais (ASCUS, ASCH, LIEBG, LIEAG, AGC, Carcinoma invasor) de citologia de base líquida e a expressão da proteína p16/Ki-67 com os resultados anatomopatológicos.

3 MÉTODOS

3.1 População do estudo

Este é um estudo transversal realizado em amostras de citologia cervical preservadas em meio líquido colhidas de 1.502 mulheres participantes de um projeto de rastreamento citológico “Prevenção de câncer anogenital: Para novos desafios, novas soluções” provenientes do “Hospital Leonor Mendes de Barros”.

3.1.1 Critérios de inclusão

- ✓ Idade de 18 a 64 anos, sexualmente ativas e que se apresentaram na instituição para rastreamento de câncer de colo uterino.
- ✓ Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) obtido da participante anterior à inclusão.

3.1.2 Critérios de exclusão

- ✓ Mulheres hysterectomizadas ou grávidas.
- ✓ Mulheres sob tratamento de neoplasias do colo uterino.

3.1.3 Tamanho da amostra

Foram incluídas no estudo original 1.502 mulheres participantes de um projeto de rastreamento do câncer cervical em um centro na cidade de São Paulo entre 18 e 64 anos, que responderam questionário que contemplava

os fatores de risco para câncer de colo do útero mais significativos nos estudos epidemiológicos (Anexo A).

O tamanho da amostra para este estudo utilizou o estudo de Santos *et al.* (2002), que obteve a prevalência de 20,7% de *Chlamydia trachomatis* em mulheres de 14 a 63 anos. Esperando encontrar uma prevalência semelhante neste estudo, com confiança de 95% e erro de 2%, seriam necessárias 1.576 mulheres para a realização do estudo, mas, devido a falhas de leitura e perdas de material, foram avaliadas 1.481 mulheres, conferindo ao estudo um erro de 2,07%¹⁵.

3.2 Descrição da casuística

As mulheres foram submetidas ao rastreamento do projeto original no período de janeiro de 2010 até agosto de 2011, no ambulatório do Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros.

A idade variou entre 18 e 64 anos, com média de 40,94 anos (dp=11,190). A maioria das mulheres pertencia à raça branca (57,8%), sendo que a raça negra foi declarada por 32,8% das mulheres.

Com relação ao estado civil, 57,1% das mulheres tinha parceiro estável, a média de escolaridade foi de 8,5 anos de educação (dp=3,601), e 85,6% do total de mulheres tinha, pelo menos, uma gestação (média=2,5, dp=1,979). O número de partos relatados foi máximo de 13 com média de 2,1 por mulher (dp=1,702).

A idade mínima da primeira relação sexual relatada foi de 5 anos com média de 18,0 anos (dp=3,976). O número de parceiros sexuais durante toda vida variou de 1 até 30, com média de 3 (dp=2,583). O número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses variou de zero até oito, com média de 0,95 (dp=0,584).

Dentre as 1.502 mulheres, 772 responderam sobre a realização de Papanicolaou anterior durante toda vida, com mínimo de nenhum exame prévio até o máximo de 36 exames, sendo a média de 8,0 (dp=6,419).

Com relação ao questionamento sobre DST anterior, respondido por 1351 mulheres, 87% declararam não ter tido DST.

De um total de 1.467 respostas sobre o tabagismo, 63,6% das mulheres declararam nunca ter fumado e 245 mulheres (16,6%) declararam-se ex-tabagistas.

3.3 Citologia

As amostras cervicais foram coletadas com escova tipo *Rover's Cervex-Brush* utilizada para a junção ectocervix/endocervical e o material foi dispensado no recipiente contendo o fixador líquido. Toda a cabeça da escova foi inserida no frasco contendo líquido *BD SurePath™* (*BD Diagnostics – TriPath*, Burlington, NC, E.U.A.), e enviada ao laboratório para preparação de lâminas segundo instruções do fabricante usando o *BD PrepMate™* e *BD PrepStain™*.

As preparações em base líquida foram realizadas por metodologia semiautomatizada conforme instruções do fabricante, e avaliadas manualmente.

As alterações citológicas foram classificadas de acordo com o Sistema de Bethesda 2001:

- Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade;
- Células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASCUS);
- Lesão intraepitelial escamsa de baixo grau (LIEBG);
- Células escamosas atípicas, não se pode afastar lesão de alto grau (ASCH);
- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG);
- Atipia das células glandulares (AGC);
- Adenocarcinoma *in situ* (AIS);
- Adenocarcinoma invasor;
- Carcinoma de células escamosas.

3.4 Colposcopia

O exame colposcópico foi solicitado a todas mulheres que apresentaram alterações citológicas iguais ou maiores que ASCUS, de acordo com o projeto original. Os resultados das colposcopias e biópsias foram obtidos pelo levantamento de prontuários.

Foram realizadas 191 colposcopias que resultaram em 79 anormais, para as quais se realizou biópsias. Ocorreram 69 perdas: mulheres previamente agendadas que não compareceram para o exame colposcópico.

3.5 Detecção de *Chlamydia trachomatis*

Foi realizada a pesquisa no líquido da citologia BD por meio do Ensaio de DNA Amplificado de *Chlamydia trachomatis* BD ProbeTec de acordo com instruções do fabricante. O Ensaio de DNA Amplificado de *Chlamydia trachomatis* BD ProbeTec ET baseia-se na amplificação e detecção simultâneas do DNA-alvo, utilizando “primers” de amplificação e uma sonda de detecção com marcação fluorescente. Os reagentes encontram-se liofilizados em duas tiras de micropoços individuais descartáveis.

A amostra processada é adicionada ao micropoço que contém os “primers” de amplificação, a sonda de detecção com marcação fluorescente e outros reagentes necessários para a amplificação. Após a incubação, a mistura da reação é transferida para o micropoço de amplificação, que contém duas enzimas (uma DNA polimerase e uma endonuclease de restrição). Os micropoços de amplificação são selados para impedir a contaminação e, em seguida, incubados num leitor de fluorescência, com controle de temperatura, que monitoriza cada reação quanto à formação de produtos amplificados. A presença ou ausência da *Chlamydia trachomatis* é determinada relacionando os resultados de BD ProbeTec ET MOTA (*Method Other Than Acceleration* – método que não o da aceleração) para a amostra

com valores limite pré-determinados. O resultado MOTA é utilizado para avaliar a grandeza do sinal produzido em resultado da reação.

Os resultados foram apresentados como positivos ou negativos por meio de um algoritmo. Se for utilizada a Embalagem de Reagentes CT/AC, as amostras e os controles são testados em dois micropoços independentes: *C. trachomatis* e o controle de amplificação. O objetivo deste controle é identificar uma amostra que possa inibir a reação de SDA.

3.6 Imunocitoquímica

Foi realizada a pesquisa da dupla marcação p16/Ki-67 CINtec PLUS, nos casos que apresentaram citologia alterada maior ou igual a ASCUS. A imunocoloração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Ventana, atual *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Germany) (Anexo B). O CINtec PLUS é um teste para detecção simultânea das proteínas p16 e Ki-67. Ele é composto por dois anticorpos, um anticorpo monoclonal de rato (clone E6H4) dirigido à proteína humana p16 e outro anticorpo monoclonal de coelho IgG (clone 274-11 AC3) dirigido à proteína humana Ki-67. O Ki-67 está presente em células em divisão nas fases G1, S, G2 e ausentes na fase G0 (quiescente).

As lâminas foram avaliadas quanto à presença de células epiteliais do colo do útero com uma coloração citoplasmática castanha e uma coloração nuclear vermelha, indicativas da expressão simultânea de p16 e do Ki-67. A presença de uma ou mais células epiteliais do colo do útero com a coloração simultânea citoplasmática castanha e coloração nuclear vermelha é interpretada como um resultado de teste CINtec® PLUS positivo.

3.7 Aspectos éticos

Todas as mulheres que participaram do estudo foram previamente informadas sobre os objetivos e as possíveis aplicações futuras dos resultados esperados pelo projeto. As mulheres que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C).

Todas as informações relatadas pelas participantes foram utilizadas para a proposta da pesquisa e a confidencialidade dos dados foi protegida durante todo o tempo. Nomes e outras informações que facilitassem a identificação foram anotados somente no questionário da pesquisa e de forma codificada. Os TCLEs assinados e os resultados de exames que possam servir como fonte de identificação, como o número do prontuário, serão mantidos em arquivo separado.

Foi assegurado a todas as mulheres que mesmo não participando do projeto teriam o mesmo tratamento, sem que houvesse qualquer constrangimento pela decisão.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Leonor Mendes de Barros (Anexos D, E e F).

3.8 Método estatístico

O estudo realizado foi de corte transversal.

As características pessoais e de comportamento quantitativas foram categorizadas e, juntamente com as características qualitativas avaliadas, foram descritas segundo presença de *Chlamydia trachomatis* e segundo positividade na citologia de base líquida com uso de frequências absolutas e relativas, verificando-se a existência de associação com uso de testes qui-quadrado ou testes da razão de verossimilhanças (Kirkwood e Sterne, 2006)⁴⁴. Foram estimados os valores de *odds ratios* (OR) com os respectivos intervalos com 95% de confiança com uso de regressões

logísticas bivariadas (Hosmer e Lemeshow, 2000) para estimar a associação das características das mulheres com a presença de *Chlamydia trachomatis*, a positividade na citologia de base líquida e a expressão do p16/Ki-76.⁴⁵

Foram estimados modelos de regressão logística múltipla (Hosmer e Lemeshow, 2000) para cada um dos desfechos, selecionando-se as variáveis que nos testes bivariados apresentaram níveis de significância inferiores a 0,20 ($p < 0,20$), mantendo-se nos modelos finais apenas as variáveis com nível de significância inferior a 0,05 ($p < 0,05$)⁴⁵.

3.9 Fluxograma

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Frequência de *Chlamydia trachomatis*

Tabela 1 – Distribuição das mulheres segundo a detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais preservadas em meio líquido

<i>Chlamydia trachomatis</i>	n	(%)
Positiva	231	15,6
Negativa	1250	84,4
Total	1481	100

A frequência de *Chlamydia trachomatis* na amostra das 1481 mulheres submetidas a rastreamento para câncer de colo uterino em amostra preservada em meio líquido de citologia foi de 15,6% (Tabela 1).

4.2 *Chlamydia trachomatis* em relação ao p16/Ki-67

Tabela 2 – Associação de *Chlamydia trachomatis* com os resultados de p16/Ki-67

p16/Ki-67							
Variável	Chlamydia				OR (IC 95%)	Total	P
	Negativo		Positivo				
	n	%	n	%			
p16/Ki-67							
Negativo	140	84,3	26	15,7	1	166	0,529
Positivo	28	80,0	7	20,0	1,35 (0,5-3,4)	35	

Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de *Chlamydia trachomatis* e a positividade do p16/Ki-67 nas citologias alteradas.

4.3 *Chlamydia trachomatis* em relação às variáveis demográficas**Tabela 3** – Associação entre a positividade para *Chlamydia trachomatis* e as variáveis demográficas

Variável	Chlamydia trachomatis				OR (IC 95%)	Total	p
	Negativo		Positivo				
	n	%	n	%			
Faixa etária							
≤ 25	125	88,7	16	11,3	1	141	0,040
26-35	295	84,5	54	15,5	1,43 (0,8-2,6)	349	
36-45	352	80,2	87	19,8	1,93 (1,1-3,4)	439	
46-55	352	86,3	56	13,7	1,24 (0,7-2,2)	408	
>55	126	87,5	18	12,7	1,12 (0,5-2,3)	144	
Escolaridade (anos)							
< 8	392	82,9	81	17,1	1	473	0,156
8-11	634	86,4	100	13,6	0,76 (0,6-1,0)	734	
> 11	182	82,4	39	17,6	1,04 (0,7-1,6)	221	
Estado Civil							
Solteiro	530	85,8	88	14,2	1	618	0,211
União estável	696	83,4	139	16,6	1,20 (0,9-1,6)	835	
Tabagismo							
Nunca	793	85,7	132	14,3	1	925	0,128
Atual	234	81,0	55	19,0	1,41 (1,0-2,0)	289	
Anterior	202	83,1	41	16,9	1,22 (0,8-1,8)	243	

Observa-se que apenas a idade apresentou relação estatisticamente significativa com a presença de *Chlamydia trachomatis* e que as mulheres entre 36-45 anos apresentaram maior frequência de infecção do que as mulheres abaixo dos 35 anos.

4.4 *Chlamydia trachomatis* em relação aos antecedentes sexuais e obstétricos

Tabela 4 – Associação entre a positividade para *Chlamydia trachomatis* e os antecedentes sexuais e obstétricos

Início da atividade sexual (anos)							
< 15	299	84,0	57	16,0	1	356	
16-19	622	84,6	113	15,4	0,95 (0,7-1,3)	735	0,875
> 19	298	85,4	51	14,6	0,90 (0,6-1,3)	349	
Número de parceiros durante a vida							
1-4	1022	85,3	176	14,7	1	1198	
5-10	195	82,3	42	17,7	1,25 (0,9-1,8)	237	0,015
>10	12	60,0	8	40,0	3,87 (1,56-9,61)	20	
Número de parceiros no último ano							
0-1	1160	84,7	209	15,3	1	1369	
2-4	75	81,5	17	18,5	1,26 (0,7-2,2)	92	0,709
>4	5	83,3	1	16,7	1,11 (0,1-9,5)	6	
Paridade							
0	230	85,2	40	14,8	1	270	
1-2	543	85,0	96	15,0	1,02 (0,7-1,5)	639	0,804
> 2	443	83,7	86	16,3	1,12 (0,7-1,7)	529	
DST anterior							
Não	999	85,5	170	14,5	1	1169	
Sim	130	80,2	32	19,8	1,45 (0,9-2,2)	162	0,083

Apenas o número de parceiros na vida influenciou estatisticamente a frequência de *Chlamydia trachomatis*. Houve maior frequência de infecção em mulheres com mais de 10 parceiros durante a vida ($p=0,015$).

4.5 Regressão logística múltipla em relação a positividade de *Chlamydia trachomatis*

Tabela 5 - Regressão logística múltipla em relação a positividade da *Chlamydia trachomatis*

Variável	OR	IC (95%)	p
Faixa etária (anos)			
≤ 25	1,00		
> 25 e ≤ 35	1,50	0,81-2,77	0,195
> 35 e ≤ 45	2,01	1,12-3,63	0,020
>45 e ≤ 55	1,35	0,73-2,47	0,339
> 55	1,26	0,61-2,63	0,532
Número de parceiros durante a vida			
1-4	1,00		
5-10	1,20	0,83-1,75	0,332
> 10	4,14	1,66-10,36	0,002

Quando testadas conjuntamente as demais características pessoais e comportamentais das mulheres, ambas variáveis permaneceram estatisticamente significativas para a presença de *Chlamydia trachomatis*, independente das demais características avaliadas nas mulheres, sendo a chance de infecção pela bactéria 4.14 vezes maior em mulheres com mais de dez parceiros, comparativamente à mulheres com 1 a 4 parceiros durante a vida ($p=0,002$). Mulheres na faixa etária de 35-45 anos apresentaram probabilidade de infecção por *Chlamydia trachomatis* duas vezes maior quando comparadas a mulheres com 25 anos ou menos ($p= 0,020$) (Tabela 5).

4.6 Associação entre os resultados da citologia e a positividade para *Chlamydia trachomatis*

Tabela 6 - Associação entre os resultados de citologia e a presença da *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis							
Citologia	Chlamydia trachomatis				OR (IC 95%)	Total	P
	Negativo		Positivo				
	n	%	n	%			
Citologia							
Normal/ Inflamatória	1038	84,8%	186	15,2	1	1224	0,935
ASCUS	45	80,4	11	19,6	1,36 (0,7-2,7)	56	
LIEBG	134	83,8	26	16,2	1,08 (0,7-1,7)	160	
LIEAG	23	82,1	5	17,9	1,21 (0,46-3,2)	28	
AGC	6	85,7	1	14,3	0,93 (0,1-7,8)	7	
Ca	1	100,0	0	0	#		

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

LIEAG: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

AGC: Atipia glandular

Ca: Carcinoma de células escamosas

Não foi observada associação entre citologia alterada e positividade para *Chlamydia trachomatis* (Tabela 6).

4.7 Associação entre os resultados anatomopatológicos de biópsias dirigidas pela colposcopia e a positividade para *Chlamydia trachomatis*

Gráfico 1 – Distribuição dos resultados anatomopatológicos segundo a presença de *Chlamydia trachomatis*

Observa-se maior frequência de NIC 1 em mulheres com resultado da pesquisa de DNA da *Chlamydia trachomatis* positivo, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,112$).

4.8 Associação entre a positividade da expressão das proteínas p16/Ki-67 em relação aos diagnósticos de lesões intraepiteliais cervicais

Tabela 7 - Associação da positividade da expressão de p16/Ki-67 em relação ao diagnóstico citológico de baixo e alto grau

Relação de diagnóstico citológico de baixo e alto grau							
Variável	Citologia				OR (IC 95%)	Total	P
	LIEBG		LIEAG/Ca invasor				
	n	%	n	%			
P16/ki67							
Negativo	141	88,1	19	11,9	1,00	160	0,003
Positivo	23	67,6	11	32,4	3,55 (1,50-8,42)	34	

LIEBG: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

LIEAG: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

Observa-se que a positividade do p16/Ki-67 apresentou associação estatisticamente significativa à presença de lesão de alto grau três vezes maior quando comparada à lesão de baixo grau.

4.9 Associação entre os resultados anormais de citologia de base líquida e a expressão das proteínas p16/Ki-67 em relação aos resultados anatomopatológicos

Tabela 8 - Associação da expressão de p16/Ki-67 com os resultados anatomopatológicos das biópsias dirigidas pela colposcopia

Variável	P16/Ki-67				OR (IC 95%)	Total	P
	Negativo		Positivo				
	n	%	n	%			
Colposcopia/Biópsia dirigida							
Colposcopia normal/sem biópsia	76	90,5	8	9,5	1,00	84	<0,001
Cervicite	22	81,5	5	18,5	2,16 (0,64-7,27)	27	
NIC 1	20	76,9	6	23,1	2,85 (0,89-9,16)	26	
NIC 2/3	4	33,3	8	66,7	19,00 (4,67-77,36)	12	
Total	122	81,9	27	18,1		149	

Teste qui-quadrado; OR e IC (95%) calculados com uso de regressão logística bivariada

NIC1 neoplasia intraepitelial cervical grau 1

NIC2 neoplasia intraepitelial cervical grau 2

NIC3 neoplasia intraepitelial cervical grau 3

Mulheres com NIC 2/3 apresentaram associação estatisticamente significativa com a positividade da expressão de p16/Ki-67 ($p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A importância de microrganismos causando doenças inflamatórias crônicas, como a *Chlamydia trachomatis*, tem sido investigada nas últimas décadas como um possível fator de risco para transmissão e persistência do HPV associada, portanto ao processo da carcinogênese do colo uterino^{46,47}.

A frequência de positividade do DNA da *Chlamydia trachomatis* encontrada neste estudo foi de 15,6%, maior do que a demonstrada em outros países, como em um estudo nos Estados Unidos, com prevalência da infecção de 4,7% em mulheres abaixo de 25 anos. Entretanto quando foi avaliado um grupo específico de mulheres da raça negra, o resultado (13,5%) foi semelhante ao nosso estudo.⁸

No Brasil, em um estudo em Goiás, dois no Paraná e um no Rio Grande do Norte, as prevalências encontradas foram de 10,9%, 10,7%, 12,7% e 10,9%, respectivamente, também compatíveis com resultado do estudo.^{12,13,17} Entretanto em trabalho realizado em Manaus, a prevalência encontrada foi de 20,7% o que pode ser explicado por diferenças regionais ou socioeconômicas¹⁵.

Em outros dois trabalhos realizados no estado de São Paulo, um na cidade de Campinas e outro na cidade de São Paulo, as taxas de prevalências foram menores: 1,1% e 8,4%, respectivamente^{10,11}. Essa diferença pode ser consequência do método de seleção da população estudada, uma vez que, em Campinas o trabalho foi realizado com mulheres provenientes de uma clínica de fertilização assistida. Como consequência, essas mulheres podem ter sido submetidas a tratamentos prévios para a infecção por *Chlamydia trachomatis*, o que justificaria a discordância encontrada. Já no trabalho realizado na cidade de São Paulo, o material foi proveniente de auto coleta do conteúdo vaginal, portanto diferente da metodologia que foi utilizada em nosso trabalho; além disso o estudo foi realizado com mulheres já matriculadas no serviço de ginecologia que

podem ter sido previamente tratadas para essa infecção¹⁴. Muitas dessas informações, casos disponíveis, seriam bastante importantes para analisarmos essas nuances de frequências.

No Brasil, a infecção *Chlamydia trachomatis* não é doença de notificação compulsória e, portanto, há poucos dados confiáveis sobre a real prevalência da mesma. Também não há programas específicos no Ministério da Saúde que incentivem o rastreio da bactéria e, por ser assintomática na maior parte dos casos, provavelmente é subdiagnosticada e consequentemente pouco tratada, podendo justificar os elevados índices de infecção encontrados neste estudo. As estimativas de prevalência de *Chlamydia trachomatis* devem ser interpretadas no contexto de diferenças nacionais e culturais, de comportamento sexual e sistema de saúde. O Brasil é um país de dimensões continentais com populações com diferentes níveis de desenvolvimento socioeconômico, o que justificaria as diferenças regionais encontradas.^{48,49,50}

Neste estudo, a faixa etária foi a única variável demográfica significativamente associada com a presença da infecção por *Chlamydia trachomatis*. As mulheres com idade entre 35 e 45 anos apresentaram maior chance de positividade para infecção do que mulheres com 25 anos ou menos. Esse é um dado diferente dos estudos realizados nos Estados Unidos, que mostraram uma maior prevalência dessa infecção nas mulheres entre 15 e 24 anos. Entretanto, vale ressaltar que nos Estados Unidos existem programas de rastreamento para toda população de mulheres com idade igual ou inferior a 25 anos, assim como, para mulheres que estejam em situação de risco para adquirir a infecção. Isto pode justificar a baixa prevalência geral, assim como, a menor taxa encontrada em mulheres com idade maior do que 25 anos, já que estas podem ter sido previamente tratadas⁸.

A faixa etária das mulheres estudadas nos trabalhos nacionais varia conforme a região. Assim, no trabalho realizado em Manaus, 80% da positividade para *Chlamydia trachomatis* foi diagnosticada em mulheres abaixo dos 23 anos. No Rio Grande do Sul, a maior frequência foi

encontrada em mulheres abaixo de 24 anos. Já com relação ao estudo no Paraná a faixa etária de maior frequência de *Chlamydia trachomatis* foi entre 23 e 40 anos, semelhante aos dados encontrados no presente estudo. A maior incidência dessa infecção em mulheres mais velhas também foi o resultado de trabalho realizado no Rio Grande do Norte, que utilizou metodologia semelhante, sendo a maior frequência de *Chlamydia trachomatis* encontrada em mulheres acima de 32 anos^{13,15,16,17}.

Ao avaliar-se outros fatores demográficos, como escolaridade, estado civil e tabagismo, não houve associação positiva para presença da *Chlamydia trachomatis*, o que também foi verificado por outros trabalhos nacionais¹⁷.

Quando analisamos os antecedentes sexuais e obstétricos, encontramos que apenas o número de parceiros durante toda a vida influenciou na positividade da presença de *Chlamydia trachomatis*. Mulheres com mais de 10 parceiros na vida tiveram quatro vezes mais chance de apresentar positividade para essa infecção do que mulheres com 1 a 4 parceiros. Isto se explica pelo fato da mesma ser uma doença de transmissão sexual e que, mesmo em uma população de baixo risco, como na amostra estudada, tem sua história associada ao comportamento de risco. Outro estudo brasileiro encontrou esta mesma associação¹⁷.

Por ser uma infecção em que 90% dos portadores do sexo feminino são assintomáticos e ser causa de inúmeras consequências, tanto para saúde reprodutiva quanto para saúde fetal, a *Chlamydia trachomatis* tem sido considerada doença não viral sexualmente transmissível de maior ônus para a saúde pública. Evidências sugerem que o rastreamento da infecção por esse patógeno é custo efetivo quando a prevalência encontrada for superior a 3%. Os poucos estudos brasileiros realizados já justificam a implementação do rastreamento sistemático em mulheres⁵¹.

O presente estudo também demonstrou a alta frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres de diferentes faixas etárias que compareceram em serviço público para rastreamento de câncer de colo uterino. Assim, foi demonstrado que com um único exame, pode-se rastrear

e conseqüentemente tratar essa infecção, com impacto na saúde reprodutiva das mulheres.

Na determinação do papel da *Chlamydia trachomatis* como cofator para neoplasias intraepiteliais cervicais ou câncer invasor, é necessário levar em conta o “status” da infecção por HPV e a história natural do câncer cervical. Como a infecção por HPV é a infecção viral sexualmente transmissível mais prevalente, enquanto que a *Chlamydia trachomatis* é a bactéria sexualmente transmissível mais frequente, as co-infecções são comuns e estão associadas a comportamento sexual ou características do parceiro sexual, o que leva à dificuldade em estabelecer o real papel da *Chlamydia trachomatis* no desenvolvimento do câncer cervical^{52, 53}.

Neste estudo, quando se avaliou a associação dos resultados anormais de citologia e a presença de infecção por *Chlamydia trachomatis*, verificou-se que esta associação não foi estatisticamente significativa. Nos resultados de citologia anormais, a maior frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi encontrada nas lesões de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASCUS), seguida de lesões escamosas de baixo grau (LIEBG). Ao se comparar com outros estudos brasileiros em mulheres na mesma faixa etária, as taxas foram semelhantes¹⁷.

Ao avaliar a associação entre a *Chlamydia trachomatis* e os resultados anatomopatológicos, observamos maior frequência de positividade de *Chlamydia trachomatis* em mulheres com NIC1. Não houve significância estatística nessa associação, o que pode ser explicado pelo baixo número de biópsias realizadas no acompanhamento após o resultado da citologia. Nenhum dos trabalhos nacionais avaliou tal associação, o que torna nossos resultados importantes no seguimento de mulheres com esta infecção. Futuramente, esperamos ampliar estes resultados.

O presente estudo também não encontrou associação de infecção por *Chlamydia trachomatis* com os resultados anormais, tanto de citologias quanto anatomopatológicos positivos para neoplasias intraepiteliais, estando de acordo com trabalho realizado recentemente no Brasil, que também não demonstrou tal associação. Esses resultados diferem de outro

estudo que encontrou associação positiva, mas utilizou a sorologia para pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e DNA HPV.^{52,26,54}

Para verificar a associação de infecção por *Chlamydia trachomatis* com a infecção por HPV foi realizada a pesquisa da expressão de p16/Ki-67 como marcador substituto da presença do DNA HPV. Este marcador apresenta a vantagem de mostrar a persistência do HPV, ao contrário do DNA HPV, que não diferencia a infecção persistente da transitória.⁵⁵ Neste estudo não houve associação entre a presença de *Chlamydia trachomatis* e a positividade do p16/Ki-67 nas citologias alteradas, sugerindo que nesta amostra estudada com ampla faixa etária, a infecção por *Chlamydia trachomatis* não interfere no processo de carcinogênese.

Ao avaliar a associação das citologias alteradas com a expressão do p16/Ki-67, encontramos que, na maioria das citologias, este marcador foi negativo. Nas mulheres com resultado citológico de alto grau, encontramos uma maior frequência de positividade (37%) em relação aos resultados de baixo grau. A positividade do p16/Ki-67 foi, portanto, associada à chance três vezes maior de lesão de alto grau. Ao comparar-se com trabalho recente que avaliou a atuação do p16/Ki-67 em uma população referenciada para colposcopia, este marcador também apresentou maior positividade nas lesões de alto grau⁴².

Verificando-se a associação da expressão do p16/Ki-67 com resultados histopatológicos, também encontramos uma maior chance de positividade do p16/Ki-67 em mulheres com resultado de NIC2 ou lesão mais grave. A positividade para o p16/Ki-67 aumentou conforme a gravidade das lesões. A dupla coloração foi positiva em 20% dos resultados de anatomopatológico com cervicite crônica, 25% de NIC1 e em 70% dos casos de NIC2 ou lesão mais grave. Ficou demonstrado que este marcador tem a capacidade de detectar a ação viral na integração celular. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, em que a atuação do p16/Ki-67 em uma população também referenciada para colposcopia mostrou valores semelhantes⁴².

Cumprе ressaltar que, devido à mesma modalidade de transmissão, a co-infecção por *Chlamydia trachomatis* e HPV é mais frequente em mulheres sexualmente ativas e, por consequência, o diagnóstico e tratamento precoces podem prevenir a propagação dessas infecções e de suas possíveis sequelas. Neste contexto, a possibilidade de uso de uma técnica molecular sensível e específica, como utilizada neste trabalho, pode aumentar a prevenção de sequelas e resultar em diminuição de incidência de lesões intraepiteliais do colo do útero.

Em síntese, este trabalho demonstrou elevada frequência de *Chlamydia trachomatis* em uma amostra de mulheres sexualmente ativas, assintomáticas, recrutadas para rastreamento de câncer de colo uterino de uma área de baixo risco para câncer cervical. Mostrou ainda que não houve associação da positividade desta infecção com as lesões citológicas e histológicas. Por outro lado, também foi demonstrado que, por meio da dupla coloração de p16/ki-67, é possível diminuir o referenciamento para colposcopia de mulheres com lesões de baixo grau na citologia e negativas para este marcador.

A elevada frequência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres submetidas a programas de rastreamento de câncer de colo uterino, justifica a necessidade de implementar a pesquisa dessa infecção em um único exame durante estes programas. Assim as mulheres positivas tanto para as lesões pré-neoplásicas quanto para *Chlamydia trachomatis* seriam tratadas e acompanhadas, aumentando a eficiência de tais programas.

São necessários futuros estudos de acompanhamento das mulheres positivas para a infecção por *Chlamydia trachomatis* e HPV para esclarecer os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na carcinogese do colo uterino.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* na amostra estudada foi de 15,6%. A associação da *Chlamydia trachomatis* com a dupla coloração para p16/Ki-67 nas citologias anormais não foi significativa, não sendo possível estabelecer uma associação clara entre a presença de *Chlamydia trachomatis* e a persistência da infecção por HPV oncogênico detectada por este marcador;
- Dentre as variáveis demográficas pesquisadas, a faixa etária apresentou associação estatisticamente significativa com a presença do DNA da *Chlamydia trachomatis*; mulheres com idade entre 35 e 45 apresentaram a maior frequência da infecção, entretanto mesmo as outras faixas etárias também mostraram alta frequência da presença desse microrganismo;
- Foi observada maior frequência da infecção entre as mulheres com mais de 10 parceiros sexuais em comparação com as com menor número de parceiros durante toda a vida e essa associação foi estatisticamente significativa;
- Não foi demonstrada associação significativa entre os resultados anormais (ASCUS, ASCH, LIEBG, LIEAG, AGC, Carcinoma invasor) da citologia com a positividade para a presença do DNA da *Chlamydia trachomatis*;
- Não foi encontrada associação significativa entre os resultados anatomopatológicos das biópsias dirigidas pela colposcopia com a positividade da infecção por *Chlamydia trachomatis*;

- A positividade da dupla coloração para p16/Ki-67 foi significativamente maior nas lesões intraepiteliais cervicais de alto grau;
- Foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre a expressão do p16/Ki-67 com os resultados anatomopatológicos das biopsias dirigidas pela colposcopia.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Questionário

Prevenção do Câncer Anogenital: Para novos desafios, novas soluções.

Data:

Prontuário

- Idade entre 18 e 64 anos
- Consentimento prévio informado

DADOS GERAIS

1. Data de nascimento: _____
2. Estado civil (1) solteira (2)outro: _____
3. Educação: _____ anos de estudo
4. Raça (1)branca (2)negra (3)mulata (4)outra _____

HISTÓRIA MÉDICA:

1. Data da última menstruação: _____
2. Idade da primeira relação: _____ anos
3. Grávida? (0)não (1)sim (2)Iginorado
4. Número de: _____ gestações _____ Parto normal _____
5. Parto cesárea _____ Abortamento
6. Número de parceiros sexuais desde 1ª relação: _____
7. Número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses: _____
8. Contracepção (1) Hormonal- quantos anos usa? _____ (2)Condom (3) DIU (4) Laqueadura (5) outros _____
9. DST anterior: (0) Não (1) Sim (2) Ignorado
10. Papanicolaou anterior (0)não (1) Sim: quatos? _____ Último data: _____

11. Fumante: (0) Nunca (1) Sim -atual_____cigarros/dia (2)Passado:
Quantos anos?_____ quantos _____por dia Quantos anos desde
que parou?_____
12. História de abuso de drogas? (0)não (1)sim

7.2 Anexo B – Estudo Imunocitoquímico

Instruções do fabricante (Ventana, atual Roche Diagnostics GmbH Mannheim Germany)

Estudo Imunocitoquímico

1. PROCEDIMENTOS DE COLORAÇÃO DE LÂMINAS

1.1 Solução de recuperação do epítipo

Preparar a quantidade de Solução de recuperação do epítipo suficiente para o procedimento de coloração que é planeado por diluição de uma quantidade de Frasco 9 (Solução de recuperação do epítipo 10 x) 1:10 utilizando água destilada ou desionizada .

1.2 Tampão de lavagem

Preparar uma quantidade de Tampão de lavagem suficiente para os passos de lavagem do procedimento de coloração que é planeado por diluição de uma quantidade do Tampão de lavagem (10 x) 1:10 utilizando água destilada ou desionizada.

1.3 Soluções de substrato-cromogênio (DAB e Fast Red)

A) Preparação da solução de trabalho DAB antes do processo de coloração

A solução de trabalho DAB permanece estável durante 8 horas após a preparação.

Preparar a solução de trabalho DAB da seguinte forma:

i) Transferir 1 ml da Solução de substrato DAB (frasco 5) para um tubo de reação limpo;

ii) Adicionar uma gota (entre 25 e 30 µl) de Cromogênio DAB (Frasco 6) e misturar cuidadosamente invertendo o tubo (não colocar no vórtex);

iii) Ao utilizar o Autostainer, transferir a solução de trabalho DAB para um frasco de reagentes Autostainer antes de iniciar o processo de coloração e colocá-la na posição apropriada no suporte do Autostainer.

B) Preparar a solução de trabalho Fast Red imediatamente antes da sua utilização, uma vez que, de outro modo, a intensidade de coloração é menor e, consequentemente, poderá ocorrer perda de sensibilização. Não colocar a solução de trabalho Fast Red no vórtex, uma vez que isto poderá resultar na formação de precipitados.

Preparar a solução de trabalho Fast Red da seguinte forma:

i) Transferir 1 ml da Solução de fosfato de naftol (Frasco 7) para um tubo de reação limpo;

ii) Adicionar uma gota (entre 40 e 45 µl) de Cromogénio Fast Red (Frasco 8) e misturar cuidadosamente invertendo o tubo (não colocar no vórtex);

iii) Ao utilizar o Autostainer, preparar a solução de trabalho Fast Red quando solicitado pelo software Autostainer. Em seguida, transferir a solução de trabalho para um frasco de reagentes Autostainer e colocá-la na posição apropriada no suporte do Autostainer. Evitar o atraso no passo "lote de substratos" durante o processo do Autostainer para minimizar o risco de secagem dos artefactos.

1.4 Contrastante

As reações de coloração DAB e Fast Red resulta num produto final colorido insolúvel em água (DAB: castanho; Fast Red: vermelho).

NOTA: Deverá utilizar hematoxilina sem álcool como contrastante, uma vez que a utilização de álcool pode afetar negativamente a intensidade do sinal gerado pelo Fast Red ou até mesmo eliminá-lo completamente. Se utilizado, cumprir as instruções fornecidas pelo fornecedor da hematoxilina para efetuar o contraste.

1.5 Meio de montagem

Para a montagem de amostras em lâminas depois da coloração, é necessário um procedimento de montagem de dois passos conforme descrito abaixo.

Em primeiro lugar, o CINtec® PLUS Mount (Frasco10), um meio de montagem permanente com base aquosa, é aplicado manualmente numa camada fina e deixado a secar (“proteção líquida”). Numa segunda fase, é aplicada uma lamela de vidro na superfície seca do meio de montagem aquoso utilizando um meio de montagem à base de xilol.

Equilibrar o CINtec® PLUS Mount à temperatura ambiente antes de utilizar e armazenar à temperatura ambiente para utilizações adicionais.

2. PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO

2.1 Rehidratação de amostras

Para todas as amostras citológicas, é necessário realizar um passo de rehidratação antes do processo de coloração. Este passo deve ser efetuado à temperatura ambiente (entre 20 – 25 °C).

B) Lâminas de citologia BD SurePath™

As lâminas de citologia BD SurePath™ fixas em álcool têm de ser submetidas a um procedimento de rehidratação especial para produzir lâminas de vidro especialmente revestidas compatíveis com o meio de proteção líquida.

- Certificar-se de que as lâminas foram completamente secas;
- Colocar as lâminas num banho fresco de 100% de xilol (utilizar tinas resistentes de xilol); mergulhar as lâminas repetidamente e incubar durante 2 minutos;
- Transferir as lâminas para um banho fresco de etanol a 99% e incubar durante 2 minutos;
- Transferir as lâminas para um banho fresco de etanol a 70% e incubar durante 2 minutos;

- Transferir as lâminas em água destilada ou desionizada e incubar durante 2 minutos.

Nota: Substituir os banhos utilizados para a desidratação após o processamento de 50 lâminas ou uma vez por semana se for processada uma quantidade inferior de lâminas.

2.2 Recuperação do epítipo

- Encher tinas de coloração resistentes ao calor (em plástico) com a Solução de recuperação do epítipo.;

- Imergir as lâminas na Solução de recuperação do epítipo; fechar a tampa da tina de coloração;

- Colocar a tina de coloração num banho de água fria e equilibrar a temperatura do banho-maria e da Solução de recuperação do epítipo para uma temperatura entre 95 – 99 °C e incubar durante 15 minutos, assim que a temperatura for atingida;

- Remover a tina completa com lâminas do banho-maria;

- Remover a tampa das tinas de coloração e deixar as lâminas arrefecer na Solução de recuperação do epítipo durante 20 (± 1) minutos à temperatura ambiente até atingir uma temperatura igual ou inferior a 50 °C;

- Transferir as lâminas para uma tina de coloração com Tampão de lavagem e incubar durante 5 (± 1) minutos antes de carregar as lâminas para o instrumento Autostainer programado. Ao utilizar o Sistema Shandon Coverplate™, montar as lâminas e lamelas de acordo com o Protocolo REF 2010-953-009EN (disponível nos Roche mtm laboratories AG).

2.3 Protocolos de coloração

2.3.1 Protocolo de coloração para Instrumentos Autostainer (Dako, LabVision)

Antes da primeira aplicação do Kit CINtec® PLUS num Instrumento Autostainer, deve ser configurado um novo modelo e os reagentes do Kit CINtec® PLUS devem ser adicionados à "Lista de reagentes" do Autostainer.

Consultar o Manual do operador do Instrumento Autostainer dedicado.

A utilização de um volume de 200 µl por lâmina é recomendada para o processamento de preparações de citologia ThinPrep® ou BD SurePath™.

- Transferir os reagentes das garrafas do kit para os frascos de reagente

Autostainer. Utilizar o mapa gerado pelo Autostainer para programar tempos e volumes de reagente;

- Colocar os frascos de reagente do Autostainer no suporte de reagentes

Autostainer de acordo com o "mapa de disposição de reagentes";

- Carregar as lâminas para o Autostainer de acordo com o "Mapa de disposição de lâminas" e lavar as lâminas com Solução de lavagem para evitar a secagem das amostras.

2.3.2 Protocolo de coloração para o Sistema Shandon Coverplate™

Montar as lâminas uma ao lado da outra com as lamelas de acordo com o Protocolo REF 2010-953-009EN (disponível nos Roche mtm laboratories AG) e colocá-las numa posição vertical no suporte de lâminas.

Verificar se a montagem do Sistema Shandon Coverplate™ está correta enchendo o reservatório de reagentes com água destilada ou desionizada (2 ml) e incubando durante 5 minutos para deixar a água sair completamente pela abertura. O sistema de lâminas e lamelas montado é à prova de fugas se a água correr lentamente pela abertura entre a lâmina e a lamela.

1. Equilibração: Encher o reservatório de reagentes com Tampão de lavagem

(2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar o tampão de lavagem sair completamente pela abertura; repetir este passo uma vez;

2. Aplicar 200 µl de Reagente de bloqueio da peroxidase. Incubar durante 5 minutos;

3. Encher o reservatório de reagentes com tampão de lavagem (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar o tampão de lavagem sair completamente pela abertura;

4. Aplicar 200 µl de Solução de anticorpos primária (p16INK4a/Ki-67). Incubar durante 30 minutos;

5. Encher o reservatório de reagentes com tampão de lavagem (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar o tampão de lavagem sair completamente pela abertura;

6. Aplicar 200 µl de Reagente de visualização de HRP. Incubar durante 15 minutos;

7. Encher o reservatório de reagentes com tampão de lavagem (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar o tampão de lavagem sair completamente pela abertura;

Repetir este passo duas vezes;

8. Aplicar 200 µl de Reagente de visualização de AP. Incubar durante 15 minutos;

9. Encher o reservatório de reagentes com tampão de lavagem (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar o tampão de lavagem sair completamente pela abertura;

Repetir este passo duas vezes;

10. Aplicar 200 µl de solução de substrato-cromogénio DAB que tenha sido preparada de acordo com o procedimento descrito na Secção 1.3 acima. Incubar durante 10 minutos;

11. Encher o reservatório de reagentes com água destilada ou desionizada (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar a água sair completamente pela abertura;

12. Encher o reservatório de reagentes com tampão de lavagem (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar o tampão de lavagem sair completamente pela abertura;

13. Aplicar 200 µl de solução de substrato-cromogénio Fast Red que tenha sido preparada de acordo com o procedimento descrito na Secção 1.3 acima. Incubar durante 15 minutos;

Nota: Para as preparações de lâminas BD SurePath™, este passo deve ser repetido uma vez.

14. Encher o reservatório de reagentes com água destilada ou desionizada (2 ml) e incubar durante 5 minutos para deixar a água sair completamente pela abertura;

Repetir este passo uma vez.

Para recuperar as lâminas, puxar cuidadosamente todo o conjunto de lâmina/lamela para fora do suporte de lâminas utilizando o polegar e o segundo dedo na traseira e, em seguida, retirar cuidadosamente a lâmina da lamela. Idealmente, este processo é realizado submerso em água.

Colocar as lâminas em água destilada ou desionizada e prosseguir com o contrastante.

2.4 Aplicar o contrastante com hematoxilina

- Mergulhar as lâminas num banho de hematoxilina sem álcool. Incubar entre 2 e 10 minutos, dependendo do potencial da hematoxilina sem álcool utilizada;

- Corar as lâminas num banho-maria de água morna ou numa solução alcalina como uma solução de amónia fraca (NH₄OH, 0,08% em água desionizada) e incubar entre 30 segundos a 2 minutos;

- Para assegurar que todos os resíduos de hematoxilina foram eliminados, substituir posteriormente a água morna na tina várias vezes (entre 3 e 5 x) com nova água morna até não conseguir observar quaisquer resíduos de coloração;

- Incubar brevemente as lâminas num banho de água destilada ou desionizada.

2.5 Montagem

Após de aplicar um contraste e corar, as lâminas deverão ser montadas seguindo um protocolo de dois passos. Os passos A e B devem ser realizados sequencialmente:

A) Liquid coverslipping

- Incubar lâminas em água destilada ou desionizada durante pelo menos 1 min;

- Remover as lâminas da água destilada ou desionizada sem qualquer secagem;
- Sacudir o excesso de líquido sem secar as amostras; limpar cuidadosamente a parte inferior das lâminas com uma toalha de papel para remover a água;
- Aplicar 4 gotas de CINtec® PLUS Mount (1 gota corresponde entre 35 a 40µl deste meio de montagem aquoso) por lâmina LBC e 8 gotas para um esfregaço convencional, respectivamente. Evitar a criação de bolhas de ar.

Para evitar a formação de pequenas bolhas, a primeira gota pode ser eliminada para uma toalha de papel antes de aplicar o CINtec® PLUS

Mount na amostra;

- Inclinar e rodar cuidadosamente a lâmina de vidro para criar uma fina camada de meio de montagem e para cobrir totalmente a amostra;
- Para a secagem de lâminas numa posição horizontal:
 - a. Incubar as amostras ThinPrep® ou BD SurePath™ a uma temperatura entre 37 – 60 °C durante 1 hora ou, de forma alternativa, durante a noite à temperatura ambiente;
 - b. Incubar esfregaços convencionais a 37 °C durante 4 horas ou a 60°C durante 1 hora ou, de forma alternativa, durante a noite à temperatura ambiente;

B) Proteções de vidro ou película

- Depois de concluir a secagem do meio de montagem aquoso, incubar as lâminas em xilol durante no mínimo 1 minuto e, no máximo, durante 20 minutos. Em seguida, proteger as lâminas utilizando um meio de montagem à base de xilol.
- Deixar o meio de montagem à base de xilol secar à temperatura ambiente;

VIII. Interpretação dos resultados

O procedimento CINtec® PLUS causa dois produtos de reação coloridos distintos: um precipitado castanho nos locais do antígeno p16INK4a e um precipitado vermelho nos locais do antígeno Ki-67. A

coloração castanha das células (citoplasma e/ou núcleo) indica uma expressão do p16INK4a. A coloração vermelha das células (núcleo) indica a expressão do Ki-67. As células que apresentam coloração para ambos os antígenos exibem, normalmente, uma coloração citoplasmática castanha com um núcleo acentuadamente vermelho.

Relativamente à interpretação de lâminas de citologias do colo do útero coradas com o Kit CINtec® PLUS, as lâminas devem ser avaliadas quanto à presença de células epiteliais do colo do útero com uma coloração citoplasmática castanha e uma coloração nuclear vermelha, indicativas da expressão simultânea de p16 e do Ki-67.

A presença de uma ou mais células epiteliais do colo do útero com a dupla coloração citoplasmática castanha e coloração nuclear vermelha dentro da mesma célula é interpretada como um resultado de teste CINtec® PLUS positivo.

Caso não existam quaisquer células epiteliais do colo do útero com coloração citoplasmática castanha e coloração nuclear vermelha, o resultado do teste CINtec® PLUS é considerado negativo.

7.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
HOSPITAL MATERNIDADE LEONOR MENDES DE BARROS
Av. Celso Garcia, 2477 – Belenzinho – CEP 03015-000 – São Paulo
tel: 2292-4188 ramal 325 fax: 2694-1999

Prevenção de câncer anogenital: Para novos desafios, novas soluções.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Senhora

Esta pesquisa visa comparar diferentes métodos de diagnóstico de câncer de colo uterino e suas lesões predisponentes. Também objetiva rastrear a infecção por um vírus chamado Papiloma Vírus Humano, em grande parte das vezes, causador do câncer de colo uterino. Os métodos são os mesmos da prática clínica do dia-a-dia e você não será submetida a nenhum novo tipo de exame que venha a lhe causar algum dano.

Caso você queira participar deste estudo, na primeira consulta será feita uma entrevista e será coletado o exame preventivo do câncer de colo uterino (exame de Papanicolaou) e o exame para investigar a presença ou não do Papiloma Vírus Humano. Se qualquer destes exames estiver alterado, você terá acompanhamento para o tratamento adequado.

Você será solicitada a responder um questionário com informações gerais, histórico sexual e histórico ginecológico.

Todos os dados obtidos a seu respeito serão mantidos em segredo pelos pesquisadores.

É dada a liberdade para você deixar de participar deste estudo a qualquer momento, pois não haverá nenhuma alteração ou prejuízo no seu atendimento. Caso você decida participar, por favor, assine este documento e entregue ao seu médico ou enfermeira, no momento da consulta. Se você tiver alguma dúvida, sinta-se à vontade para perguntar.

Neste projeto você não irá receber nenhum medicamento e sua participação não terá nenhuma influência no seu tratamento neste hospital. Não haverá riscos para você neste projeto. Não haverá qualquer reembolso.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o projeto em si foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros. Ao assinar este termo de consentimento, você não está abrindo mão de qualquer direito legal.

Você pode conversar com o médico do projeto sobre todas as dúvidas ou problemas que tenha em relação a esse projeto. Contate a médica do projeto: Dra Cecília no telefone (11) 2694.1999.

Em caso de dúvidas sobre seus direitos durante a participação neste projeto, ligue para Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, no (11) 2292.4188.

Li, ou alguém leu para mim, as informações contidas neste termo de consentimento, e tive a oportunidade de fazer perguntas que me ajudaram a entender o que a minha participação vai envolver. Eu dou minha permissão livremente para participar do projeto a não ser que eu não queira.

Minha assinatura ou impressão digital indicam que tudo relacionado ao estudo foi explicado para mim. Eu vou assinar e datar duas cópias deste termo de consentimento. Eu vou guardar uma delas e o médico do projeto vai guardar a outra nos seus arquivos.

Sendo assim, assine abaixo, afirmando que você leu e compreendeu o que foi exposto e aceita participar do estudo.

Nome da mulheres

Assinatura da mulheres

____/____/____
Data

Eu, abaixo assinado, expliquei total e cuidadosamente o projeto de coleta de dados para esta mulheres, e certifico que, de acordo com o melhor do meu conhecimento, a mulheres compreendeu claramente a natureza, a finalidade e as consequências de sua participação neste projeto.

Nome do membro da equipe que aplica o consentimento

Assinatura do membro da equipe que aplica o consentimento

____/____/____
Data

7.4 Anexo D – Cadastro de Protocolo de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP CEP-FMUSP

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria)

Nº do Protocolo: Tipo: Humanos Instituto: FMUSP

Registro on-line nº: 9930 Data de Entrada: 20/09/2012

Informações sobre o animal:

Quantidade: 0 OGM: Não

Espécies utilizadas: Não informado

Este projeto envolve:

Pacientes HCNão

Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa)Não

Documentos HC(Prontuários e Outros)Não

Materiais estocados no HCNão

Peças anatômicas de cadáveresNão

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Prevalência de Papilomavírus Humano oncogênico, Chlamydia Trachomatis e Neisseria Gonorrhoeae em mulheres participantes de rastreamento de câncer cervical

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Human papillomavirus 16, Human papillomavirus 18, cancer de colo, Chlamydia

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

O objetivo primário deste estudo será verificar a prevalência de infecções genitais por Papilomavirus humano oncogênicos e Chlamydia trachomatis, em uma amostra de mulheres participantes de um programa de rastreamento, em um hospital referência do Sistema Público de Saúde da cidade de São Paulo. Também serão avaliados outros fatores como idade, paridade, tabagismo, alterações citológicas e coinfeção.

4. Pesquisador Responsável:

Edmund Chada Baracat

<http://lattes.cnpq.br/6673575718045572>

Graduação: Medicina

Vínculo: FMUSP

5. Pesquisador Executante:

Renata Robial

<http://lattes.cnpq.br/1493111479908438>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Adhemar Longatto Filho e Maricy Tacla

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Obstetrícia e Ginecologia

Disciplina: Ginecologia

LIM: Nenhum

8. Existe entidade externa envolvida?

Sim

Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros
Nacional

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Mestrado

13. Investigação

Retrospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Prontuários de pacientes

Tecidos, órgãos, fluídos orgânicos

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Epidemiológica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Nenhuma das alternativas

17. Patrocínio

Não há patrocínio

18. Valor do financiamento

0,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 12 meses

20. Assinaturas

Prof. Dr. Edmund C. Baracat
Professor Titular de Ginecologia
DDG/FMUSP

Assinatura e carimbo do Pesquisador

Aprovado em ____/____/____.

Prof. Dr. MARCELO ZUGAIB
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
DDG/FMUSP

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento

Aprovado em 25/07/2012

7.5 Anexo E – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
- FMUSP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Prevalência de Papilomavírus Humano oncogênico e Chlamydia Trachomatis em mulheres participantes de rastreamento de câncer cervical

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06562112.6.0000.0065

Pesquisador: Edmund Chada Baracat

Instituição: Fundação Faculdade de Medicina - ICESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 105.852

Data da Relatoria: 25/09/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto já aprovado pelo CEP do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, não envolverá pacientes atendidos na instituição. Para afeitos de pós-graduação, tomamos ciência da execução deste projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Pós-graduação

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliado anteriormente pelo CEP do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros e aprovado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Ciência e encaminhamento para CPG

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Confirma-se aprovação prévia do CEP do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: 1130-6170

Fax: 1130-6175

E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
- FMUSP

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 25 de Setembro de 2012

Assinado por:
Roger Chammas

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: 1130-6170 **Fax:** 1130-6175 **E-mail:** cep.fmusp@hcnet.usp.br

7.6 Anexo F – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros - UGA IV

PROJETO DE PESQUISA

Título: Prevalência de Papilomavírus Humano oncogênico, Chlamydia Trachomatis em mulheres participantes de rastreamento de câncer cervical

Área Temática:

Pesquisador: Renata Robial

Versão: 2

Instituição: Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros

CAAE: 05330412.1.0000.0063

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 74111

Data da Relatoria: 14/08/2012

Apresentação do Projeto:

O carcinoma cervical é o segundo tipo de câncer que mais atinge as mulheres no mundo, sendo que 70,9% das lesões cervicais invasivas estão associadas ao HPV 16 e 18. As lesões de colo uterino induzidas por HPV são passíveis de prevenção; entretanto, na maior parte dos países em desenvolvimento as mulheres não têm acesso aos programas de rastreamento. A prevalência do HPV aumenta com a severidade das lesões e está relacionado ao câncer cervical em praticamente 100% dos casos. Entre todos os tipos de câncer, o de colo uterino foi o terceiro causador de morte entre mulheres brasileiras no ano de 2007 segundo estimativas do Ministério da Saúde publicadas no Plano Nacional de Saúde em dezembro de 2009.

A infecção persistente por HPV oncogênico é causa necessária, mas não suficiente para a carcinogênese do colo uterino. Alguns co-fatores como tabagismo, anticoncepcionais hormonais, multiparidade, número de parceiros sexuais, constituição genética e o estado imunológico da pessoa infectada além da co-infecção com outros patógenos são descritos. A prevalência de infecção genital por Chlamydia trachomatis e papilomavírus humano oncogênico situa-se em torno de 10% e 20% respectivamente em uma população de 1500 mulheres rastreadas para câncer de colo.

Objetivo da Pesquisa:

1. Verificar a prevalência de infecções genitais por Papilomavirus humano oncogênicos e Chlamydia trachomatis, em uma amostra de mulheres participantes de um programa de rastreamento, em um hospital referência do Sistema Público de Saúde da cidade de São Paulo;
2. Verificar a associação entre os resultados anormais de citologia de base líquida e a presença de infecções por Papilomavirus humano oncogênico e Chlamydia trachomatis.
3. Analisar fatores de risco demográficos selecionados como: faixa etária, escolaridade, raça e tabagismo.
4. Analisar fatores de risco de comportamento sexual selecionados como: idade ao início da atividade sexual, número de parceiros durante a vida sexual, número de parceiros no último ano e paridade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferece riscos às voluntárias. O benefício será verificar a prevalência de duas infecções genitais de transmissão sexual que acometem a saúde da mulher, cujos resultados poderão contribuir para implantação de programas de rastreamentos futuros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo transversal com análise de 1500 amostras de citologia líquida colhidas no ano de 2010 de mulheres com idade de 18 a 65 anos, participantes do programa de rastreamento citológico Prevenção de câncer anogenital: Para novos desafios, novas soluções, provenientes do Hospital Leonor Mendes de Barros, cujas voluntárias assinaram previamente um termo de consentimento livre e esclarecido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As solicitações referentes aos currículos dos pesquisadores, o resumo sobre o projeto anterior, a carta de aprovação e o TCLE do projeto anterior em que este estudo é baseado.

Recomendações:

O colegiado recomenda esclarecimento sobre o critério de composição do tamanho amostral. Se a infecção por Chlamydia for detectada nas amostras, as pacientes serão convocadas e submetidas a tratamento?

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram respondidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Na data de emissão desse parecer estava pendente (1) parecer de instituições coparticipantes.

SAO PAULO, 14 de Agosto de 2012

Assinado por:
Regina Dias de Barros

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Bebear C, de Barbeyrac B. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(1):4-10.
2. Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M. Genital Chlamydia trachomatis: an update. *Indian J Med Res*. 2013; 138(3):303-16.
3. Choroszy-Krol IC, Frej-Madrzak M, Jama-Kmiecik A, Bober T, Jolanta Sarowska J. Characteristics of the Chlamydia trachomatis species - immunopathology and infections. *Adv Clin Exp Med*. 2012; 21(6): 799-808.
4. 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.
5. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(5): a010256.
6. Bohme L, Albrecht M, Riede O, Rudel T. Chlamydia trachomatis-infected host cells resist dsRNA-induced apoptosis. *Cell Microbiol*. 2010; 12(9):1340-51.
7. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infection*. 2008. 2012. [Cited 2015 jan 20]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/>.
8. Torrone E, Papp J, Weinstock H. Prevalence of Chlamydia trachomatis genital infection among persons aged 14-39 years--United States, 2007-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014; 63(38):834-8.
9. Motta D, Silva AD, Macedo ABRB, Carvalho ACT. *Vigilância epidemiológica dos agravos de notificação compulsória*. Brasília (DF): SES/DF; 2003.
10. Fernandes LB, Arruda JT, Approbato MS, Garcia-Zapata MT. [Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um service public de reprodução humana. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014; 36(8):353-8.

11. Pantoja M, Campos EA, Pitta DR, Gabiatti JE, Bahamondes MV, Fernandes AM. Prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres candidatas à fertilização *in vitro* em serviço público de referência do Estado de São Paulo. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012; 34(9):425-31.
12. Piazzetta RC, de Carvalho NS, de Andrade RP, Piazzetta G, Piazzetta SR, Carneiro R. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* infections in sexual actives young women at a southern Brazilian city. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011; 33(11):328-33.
13. Abreu AL, Nogara PR, Souza RP, Silva MC, Uchimura NS, Zanko RL, Ferreira EC, Tognim MC, Teixeira JJ, Gimenes F, Consolaro ME. Molecular detection of HPV and *Chlamydia trachomatis* infections in Brazilian women with abnormal cervical cytology. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 87(6): 1149-51.
14. Luppi CG, Oliveira RL, 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.
15. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis*. 2003; 7(2):91-5.
16. Garces AX, de Martinez AM, Goncalves CV, Germano FN, Barral MF, Vieira VC. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* e fatores de risco associados à infecção detectada em amostra endocervical.. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2013; 35(8): 379-83.
17. Magalhaes PA, Miranda CA, Lima EG, Moizeis RN, Lima DB, Cobucci RN, de Medeiros Fernandes TA, de Azevedo JC, de Azevedo PR, de Araújo JM, Fernandes JV. Genital tract infection with *Chlamydia trachomatis* in women attended at a cervical cancer-screening program in Northeastern from Brazil. *Arch Gynecol Obstet*. 2015; 291(5): 1095-102.
18. Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC, Garcia EG, Moherdau F, Barbosa MJ. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008; 30(12): 614-9.
19. Huang CT, Li SY. Protocol for the use of a bead array for the multiple detection of genotype of *Chlamydia trachomatis*. *Methods Mol Biol*. 2012; 903:195-204.

20. Hafner LM. Pathogenesis of fallopian tube damage caused by Chlamydia trachomatis infections. *Contraception*. 2015; 92(2): 108-15.
21. Darville T, O'Neill JM, Andrews CW Jr, Nagarajan UM, Stahl L, Ojcius DM. Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J Immunol*. 2003; 171 (11): 6187-97.
22. den Hartog JE, Morre SA, Land JA. Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update*. 2006; 12 (6): 719-30.
23. Hafner LM, Cunningham K, Beagley KW. Ovarian steroid hormones: effects on immune responses and Chlamydia trachomatis infections of the female genital tract. *Mucosal Immunol*. 2013; 6(5): 859-75.
24. Hjelholt A, Christiansen G, Johannesson TG, Ingerslev HJ, Birkelund S. Tubal factor infertility is associated with antibodies against Chlamydia trachomatis heat shock protein 60 (HSP60) but not human HSP60. *Hum Reprod*. 2011; 26 (8): 2069-76.
25. Marrazo J, Suchland R. Recent advances in understanding and managing *Chlamydia trachomatis* infections. F1000. *Prime Rep*. 2011; 6:120.
26. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004; 111 (3): 431-9.
27. Oliveira ML, Amorim MM, Souza AS, Albuquerque LC, Costa AA. Chlamydia infection in patients with and without cervical intra-epithelial lesions. *Rev Assoc Med Bras*. 2008; 54(6): 506-12.
28. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10(10): 1021-7.
29. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; 289(4): 715-23.
30. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010; 117(2 Suppl): S5-10.
31. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004; 78(21): 11451-60.

32. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006 Suppl:40470.
33. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. The clinical impact of using p16 immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer*. 2015;136 (12):2741-51.
34. Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012;126(2):198-202.
35. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000;132(10):810-9.
36. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M, van den Akker E. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess*. 1999;3(14):i-iv, 1-196.
37. Krahn M, McLachlin M, Pham B, Rosen B, Sander B, Grootendorst P, et al. *Liquid-based techniques for cervical cancer screening: systematic review and cost-effectiveness analysis* [Technology report number 103]. Ottawa: Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2008.
38. Arbyn M, Roelens J, Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PP, Prendiville WJ. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 3: CD008054.
39. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(20): 1550-7.
40. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, Rodriguez-Carunchio L, Torne A, del Pino M. Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol*. 2014; 122(3): 227-35.

41. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol.* 2014; 122(12):914-20.
42. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M.. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(15): 4154-62.
43. Beal CM, Salmeron J, Flores YN, Torres L, Granados-Garcia V, Dugan E, Lazcano-Ponce E. Cost analysis of different cervical cancer screening strategies in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2014; 56(5): 429-501.
44. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts: Blackwell science, USA; 2006.
45. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2nd ed. New York: Wiley; 2000.
46. Luostarinen T, Namujju PB, Merikukka M, Dillner J, Hakulinen T, Koskela P, Paavonen J, Surcel HM, Lehtinen M. Order of HPV/Chlamydia infections and cervical high-grade precancer risk: a case-cohort study. *Int J Cancer.* 2013; 133(7):1756-9.
47. Shew ML, Ermel AC, Weaver BA, Tong Y, Tu W, Kester LM, et al. Association of Chlamydia trachomatis infection with redetection of human papillomavirus after apparent clearance. *J Infect Dis.* 2013; 208(9):1416-21.
48. Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104_25_01_2011.html. Acessado em: 25 out. 2014.
49. Redmond SM, Alexander-Kisslig K, Woodhall SC, van den Broek IV, van Bergen J, Ward H, et al. Genital chlamydia prevalence in Europe and non-European high income countries: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0115753.
50. Low N, Cassell JA, Spencer B, Bender N, Hilber AM, van Bergen J, et al. Chlamydia control activities in Europe: cross-sectional survey. *Eur J Public Health.* 2012; 22(4): 556-61.
51. Owusu-Edusei K, Jr., Chesson HW, Gift TL, Tao G, Mahajan R, Ocfemia MC, et al. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis.* 2013; 40(3): 197-201.

52. Safaeian M, Quint K, Schiffman M, Rodriguez AC, Wacholder S, Herrero R, et al. *Chlamydia trachomatis* and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. *J Nat Cancer Inst.* 2010; 102(23): 1794-1804.
53. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199(6): 617 e1-7.
54. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5:F24-33.
55. Longatto Filho A, Utagawa ML, Shirata NK, Pereira SM, Namiyama GM, Kanamura CT, Santos Gda C, de Oliveira MA, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, Mattosinho de Castro Ferraz Mda G, Maeda MY, Alves VA, Syrjänen K. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol.* 2005 Apr; 24(2):118-24.