

Jani Viviana Alves Vital da Silva

**Caracterização molecular de agentes infecciosos associados ao desenvolvimento do cancro do colo do útero em jovens no Norte de Portugal: Estudo do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis***

**Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011**



Jani Viviana Alves Vital da Silva

**Caracterização molecular de agentes infecciosos associados ao desenvolvimento do cancro do colo do útero em jovens no Norte de Portugal: Estudo do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis***

Assinatura:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Microbiologia Clínica sob a orientação do Professor Doutor Rui Medeiros e co-orientação da Professora Doutora Maria de Fátima Cerqueira de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

## SUMÁRIO

As doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) constituem um grave problema de saúde de adolescentes e adultos jovens. O Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* são os agentes mais comuns das DSTs em mulheres jovens.

O presente estudo teve como objectivo caracterizar a presença de infecção por HPV e *C. trachomatis* em jovens estudantes do sexo feminino que frequentavam o ensino público e privado, residentes na região norte de Portugal. Este estudo transversal incluiu 435 amostras de células do colo uterino, obtidas por auto-colheita através do *kit* comercial *Universal Collection Medium* (UCM). Os dados demográficos, história sexual e ginecológica foram obtidos por questionário anónimo. O HPV e *C. trachomatis* foram detectados por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e a genotipagem do HPV foi realizada por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

Os resultados obtidos demonstraram que a idade mediana das participantes foi de 17,0 anos; a frequência de jovens sexualmente activas foi de 63,7% (n=277) com idade mediana de coitarca de 16,0 anos; a mediana do número de anos após a primeira relação sexual foi de 2,0; 33,9% (n=94) das estudantes sexualmente activas referiram ter de 2 a 5 parceiros sexuais. A prevalência de HPV e *C. trachomatis* foi de 16,6% e 8,7%, respectivamente, considerando apenas as jovens que referiram ter iniciado a actividade sexual; os tipos de HPV mais frequentemente isolados foram HPV31, 16, 53 e 61. A análise estatística identificou a idade mediana, o número de parceiros sexuais, número de anos de actividade sexual e nível de ensino, como factores de risco para a aquisição do HPV. Por outro lado, a vacinação contra o HPV mostrou ser um factor de protecção. Foi observada uma correlação positiva entre a distribuição de *C. trachomatis* com a idade mediana, idade mediana de coitarca e nível de ensino.

Em conclusão, em mulheres jovens assintomáticas, a infecção por HPV é comum nas estudantes universitárias com 2-5 parceiros sexuais e mais dois anos de actividade sexual; a infecção por *C. trachomatis* foi mais frequente nas estudantes universitárias e que iniciaram a actividade sexual depois dos 16 anos. Não se verificou associação estatística entre as co-infecções pelos agentes em estudo. O conhecimento do perfil do HPV e *C. trachomatis*, em mulheres jovens pode ser importante para uma melhor avaliação de medidas preventivas em diferentes populações.

## ABSTRACT

Sexually transmitted diseases (STDs) are a major public problem concern in adolescents and young adults. The Human Papillomavirus (HPV) and *Chlamydia trachomatis* infection are the most common agents found in STDs in younger women.

The present study aimed to characterize the HPV and *C. trachomatis* infection status in female students from public and private education resident in the northern region of Portugal. This cross-sectional study included 435 samples of cervical cells, obtained by self-collection using the commercial kit Universal Collection Medium (UCM). Demographic data, sexual and gynecological history were obtained through an anonymous questionnaire. HPV and *C. trachomatis* were detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) and HPV genotyping was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP).

The results revealed that the median age of participants was 17.0 years; the frequency of sexually active women in the group was of 63.7% (n=277) with median age of first sexual intercourse of 16.0 years and a median number of years after first sexual intercourse of 2.0 years and 33.9% (n=94) of the sexually active women had 2 to 5 sexual partners. HPV and *C. trachomatis* prevalence was 16.6% and 8.7%, respectively, considering only those who were sexually active; the most frequent HPV types found were HPV31, 16, 53 and 61. Statistical analysis identified median age, the number of lifetime sexual partners, years of sexual activity, education level, as risk factors for HPV acquisition; additionally, we found a protection factor regarding the status of HPV vaccination. Statistical significant differences were observed when comparing *C. trachomatis* distribution to median age, median age of first sexual intercourse and education level.

Hence, our study revealed that, in young asymptomatic women, HPV infection is common in university females with 2-5 sexual partners and over 2 year of sexual activity; *C. trachomatis* infection was more frequent in university students and who initiated sexual activity over the 16. There was no statistical association between co-infections by the agents under study. Ultimately, the knowledge of HPV and *C. trachomatis* profile in young women may be important to appraise better preventive measures within different populations.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, indispensável para crescimento do meu conhecimento científico.

Ao Prof. Doutor Rui Medeiros, meu orientador neste trabalho, pela oportunidade, orientação, conhecimentos transmitidos e disponibilidade demonstrada em todo o desenvolvimento desta tese.

À Prof. Doutora Fátima Cerqueira, minha co-orientadora, por toda a disponibilidade, ajuda, pelas indispensáveis sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho de investigação.

Agradeço aos dois por tudo, e principalmente, pela imensa amabilidade e qualidades humanas.

Ao Núcleo Regional Norte da Liga Portuguesa Contra o Cancro, especialmente à Dra. Teresa Osório, pela vivacidade, disponibilidade, apoio na recolha da amostragem e também pelas gargalhadas que me proporcionou!

À Universidade Fernando Pessoa, na pessoa do Digníssimo Reitor Professor Doutor Salvato Trigo.

À Comissão Organizadora do mestrado, por toda a simpatia, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo destes dois anos, bem como pelas condições que os professores sempre se preocuparam em criar para o desenvolvimento dos projectos de investigação em microbiologia.

Um agradecimento a todos os colegas do Grupo de Oncologia Molecular, Instituto Português de Oncologia do Porto, em especial à Ana Luísa Teixeira pela ajuda e disponibilidade que sempre demonstrou. Gostaria também de agradecer ao Dr. Hugo Sousa e Joana Ribeiro pelo sincero companheirismo manifestado neste trabalho.

Aos colegas de laboratório, agradeço a simpatia, respeito e o bom ambiente de trabalho. Em especial, ao Ricardo Silva, técnico CEBIMED, pela paciência e conhecimento transmitido.

À Joana Bessa, Inês Guimarães e Filipa Fael, obrigado pelo incentivo, coragem, carinho e amizade que desde sempre demonstraram. Obrigada pelas gargalhas e pelos “chazinhos” que tomámos na companhia de uma boa conversa!

À Susana, obrigada pela amizade, carinho e compreensão que desde o início demonstraste. Pelas gargalhadas que demos e até pelas lágrimas que choramos. Estarás sempre no meu coração!

Ao Miguel, que tantas vezes ouviu: “Não posso, tenho a tese para escrever!” Obrigada pela paciência e apoio, que me ajudam a seguir em frente...E desculpa o “mau-feitio”, fruto das horas sentada ao computador!

À minha irmãzinha Salomé, indispensável na minha vida... Apesar da nossa diferença de idade, obrigada por me ouvires e por me considerares a “chata” da tua irmã mais velha!

Finalmente, uma palavra aos meus pais, por se esforçarem inesgotavelmente para nos proporcionar uma vida melhor... Obrigada pelo amor, valores, educação, apoio, coragem, paciência... enfim... Não posso deixar de referir o vosso exemplo, que mesmo nos piores dias, que tudo parece escuro, com um força de vontade extraordinária e trabalho honesto, tudo se consegue... Não há dias maus, há dias menos bons! O meu sincero OBRIGADA!

LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
NOMENCLATURA.....	vi
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. Papilomavírus Humano .....	1
1.1. Organização genómica.....	1
1.2. Ciclo de vida .....	3
1.3. HPV e carcinogénese do colo uterino .....	4
1.4. Classificação epidemiológica do HPV.....	6
1.5. Epidemiologia da infecção por HPV e Cancro do Colo do Útero .....	7
1.6. Factores de risco e infecção por HPV .....	9
1.7. Métodos de auto-colheita cervico-vaginal .....	10
1.8. Métodos de detecção do HPV e lesões do colo do útero .....	11
1.9. Estratégias educativas e profiláticas .....	14
2. Infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> e seu papel como co-factor do HPV na carcinogénese cervical .....	16
3. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	17
3.1 Infecção e patogénese .....	18
3.2 Epidemiologia da infecção.....	19
3.3 Factores de risco .....	20
3.4 Manifestações clínicas .....	20
3.5 Métodos de detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	21
<b>II. OBJECTIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
1. Aspectos éticos .....	24
2. População em estudo .....	24
3. Colheita da amostra (Método de auto-colheita) .....	25
4. Procedimentos laboratoriais .....	26
4.1. Processamento das amostras .....	26
4.2. Isolamento de ácidos nucleicos.....	26
4.3. Quantificação de DNA.....	26

4.4.	<i>Polymerase Chain Reaction</i> .....	26
4.4.1.	Controlo do método de extracção de DNA .....	27
4.4.2.	Detecção de DNA do HPV .....	27
4.4.3.	Detecção de DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	28
4.5.	Genotipagem do HPV por RFLP .....	29
5.	Análise estatística .....	30
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
1.	Caracterização da população em estudo .....	31
2.	Distribuição do HPV .....	34
2.1.	Cálculo do risco para a infecção por HPV .....	39
3.	Distribuição de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	40
3.1.	Cálculo do risco para a infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	42
4.	Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> na presença ou ausência do HPV .....	43
<b>V.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>54</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>67</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Funções dos genes que compõem o genoma viral.....	3
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados .....	28
<b>Tabela 3.</b> Caracterização da população em estudo .....	33
<b>Tabela 4.</b> Frequência de HPV nas mulheres sexualmente activas .....	35
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos diferentes tipos de HPV de acordo com o nível de ensino ..	38
<b>Tabela 6.</b> Factores de risco para a infecção por HPV.....	39
<b>Tabela 7.</b> Caracterização da população e infecção por <i>C. trachomatis</i> nas mulheres sexualmente activas .....	40
<b>Tabela 8.</b> Factores de risco para a infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da organização do genoma do HPV16, que pode ser dividido em três regiões funcionais: a região precoce (E) que codifica seis proteínas, E1, E2, E4, E5, E6 e E7; a região tardia (L) L1 e L2 e, região regulatória (LCR) ..... 2
- Figura 2.** Representação do ciclo de vida do HPV, organização do genoma e sua integração no genoma do hospedeiro. Genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), genes tardios (L1 e L2) e região regulatória (LCR) ..... 5
- Figura 3.** Representação esquemática da acção das proteínas E6 e E7 do HPV nas proteínas p53 e pRb (Retinoblastoma), respectivamente ..... 6
- Figura 4.** Incidência mundial de cancro do colo do útero por 100 000 mulheres de todas as idades..... 8
- Figura 5.** Representação do modelo etiológico da infecção por HPV e cancro do colo uterino, ilustrando o possível papel de factores de risco na infecção persistente e evolução de lesões ..... 10
- Figura 6.** Representação da *open reading frame* (ORF) L1 indicando a posição dos quatro conjuntos de *primers* mais utilizados na detecção do HPV ..... 13
- Figura 7.** Representação do ciclo de multiplicação. A infecção produtiva envolve: invasão das células do hospedeiro (1,2); diferenciação dos corpos elementares (CEs) em corpos reticulares (CRs) (3); crescimento e divisão intracelular dos CRs (4); diferenciação dos CRs em CEs e evasão às células do hospedeiro (5,6) ..... 18
- Figura 8.** Representação do *kit* comercial *Universal Collection Medium* (UCM) da Digene (São Paulo, Brasil) para colheita de células do colo do útero..... 25
- Figura 9.** Representação esquemática do processo de auto-colheita..... 25
- Figura 10.** Frequência de distribuição da idade..... 31
- Figura 11.** Frequência de distribuição da idade de menarca ..... 32
- Figura 12.** Frequência de distribuição da idade de coitarca ..... 32

**Figura 13.** Prevalência dos diferentes tipos de HPV para as mulheres sexualmente activas ..... 37

## NOMENCLATURA

ASCUS – *Atypical squamous cells of undetermined significance* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)

ATP – Adenosina trifosfato

pb – pares de base

CCU – Cancro do Colo do Útero

CDC – *Centre for Disease Control and Prevention*

CEs – Corpos Elementares

CRs – Corpos Reticulares

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DFA – *Direct Fluorescent Staining with Monoclonal Antibodies* (Imunofluorescência Directa)

dNTPS – *Deoxynucleotide Triphosphate* (Dinucleosídeos Trifosfatados)

DST – Doença Sexualmente Transmissível

E2F – Factor de Transcrição

EIA – *Enzyme Immunoassay* (Ensaio Imunoenzimático)

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV – *Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano)

HSV – *Herpes Simplex Virus* (Herpesvírus Simples)

HSIL – *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Pavimentosa Intra-epitelial de Alto Grau)

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

LCR – *Long Control Region* (Região Regulatória)

LSIL – *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Pavimentosa Intra-epitelial de Baixo Grau)

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds ratio*

ORF – *Open Reading Frames* (Regiões de leitura aberta)

PID – *Pelvic Inflammatory Disease* (Doença Inflamatória Pélvica)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato)

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

μL – Microlitro

μM – Micromolar

mM – Milimolar

ng – Nanograma

nm – Nanómetro

NOTA:

A notação Anglo-saxónica foi mantida por ser mais facilmente reconhecida pela comunidade científica.

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Papilomavírus Humano

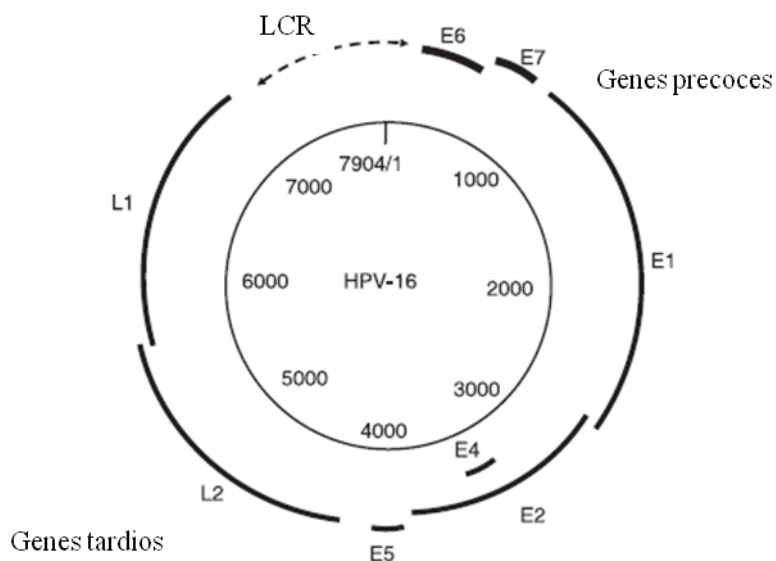
Os papilomavírus (PVs) são um grupo heterogéneo de vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) pertencentes à família *Papillomaviridae*. Estes podem infectar vários animais, desde aves a mamíferos, incluindo o Homem. Até à data, são conhecidos mais de uma centena de PVs, com capacidade de infectar o tracto anogenital, pele, cavidade nasal e orofaríngea. A infecção por PV está limitada às células epiteliais, sendo necessário para o seu ciclo de vida a diferenciação celular (De Villiers *et al.*, 2004).

Os papilomavírus humanos (HPVs) foram agrupados em cinco géneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Mu-* e *Nu-* *papillomavirus*. O maior grupo, *Alphapapillomavirus*, inclui os HPVs genitais, bem como alguns HPVs com capacidade de infectar a mucosa oral (De Villiers *et al.*, 2004).

#### 1.1 Organização genómica

O HPV é um vírus de DNA circular de cadeia dupla (ds), de 52-55 nm de diâmetro, não possui invólucro e apresenta um capsídeo viral icosaédrico composto por 72 capsómeros. Dado não possuírem invólucro, os viriões são pouco imunogénicos (Doorbar, 2005; Zheng e Baker, 2006).

O genoma viral apresenta cerca de 8000 pares de base (pb) e está dividido em duas regiões codificantes e uma não codificante (Doorbar, 2005; Zheng e Baker, 2006). As duas regiões codificantes compreendem *open reading frames (ORFs)* cuja expressão é dependente da fase de diferenciação da célula hospedeira. Assim, de acordo com o momento de transcrição dos genes no ciclo viral, o genoma divide-se numa região precoce (*Early Region, E*), numa região tardia (*Late Region, L*) e numa região regulatória (*Long Control Region, LCR*), (Fehrmann e Laimins, 2003; Zheng e Baker, 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da organização do genoma do HPV16, que pode ser dividido em três regiões funcionais: a região precoce (E) que codifica seis proteínas, E1, E2, E4, E5, E6 e E7; a região tardia (L) L1 e L2 e, região regulatória (LCR), (adaptado de Narisawa-Saito e Kiyono, 2007).

A região precoce codifica seis *ORFs*: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que estão envolvidas na transcrição, replicação, maturação viral e transformação celular. A região tardia codifica as *ORFs* L1 e L2, a maior e menor proteína da cápside, respectivamente, responsáveis pela síntese de proteínas estruturais necessárias para a produção do capsídeo viral. Os genes E1, E2, L1 e L2 são os mais conservados nos diferentes tipos de HPVs, sendo o gene L1 o que apresenta maior nível de conservação (Zheng e Baker, 2006). As funções respectivas de cada *ORF* viral estão descritas na tabela 1 (Narisawa-Saito e Kiyono, 2007).

Por fim, a região regulatória (LCR) está localizada entre os genes L1 e E6, e tem funções não codificantes, regula a transcrição e replicação viral (De Villiers *et al.*, 2004; Zheng e Baker, 2006).

**Tabela 1.** Funções dos genes que compõem o genoma viral do HPV

	<i>ORFs</i>	<b>Função</b>
<b>Região precoce</b>	E1	Inicia a replicação do DNA viral
	E2	Modulação da transcrição e replicação viral
	E4	Maturação do vírus
	E5	Interacção com factores de crescimento
	E6	Oncoproteína: interacção com a proteína p53
	E7	Oncoproteína: interacção com a proteína pRb
<b>Região tardia</b>	L1	Maior proteína da cápside
	L2	Menor proteína da cápside

E, *Early Region* (Região precoce); L, *Late Region* (Região tardia)

## 1.2. Ciclo de vida

HPV é considerado um vírus epiteliotrópico, ou seja, só tem capacidade de infectar células epiteliais e o seu ciclo de vida ocorre nos núcleos das células epiteliais estratificadas, estando intimamente ligado ao grau de diferenciação celular (Zur Hausen, 2002).

A infecção pelo HPV pode ocorrer quando existe microabrasão da mucosa cervical, originando perda da integridade do epitélio de revestimento, que permite ao vírus aceder às células da camada basal (Zur Hausen, 2002). O receptor de ligação do vírus às células do hospedeiro é ainda desconhecido, embora estudos sugiram que o sulfato de heparina é necessário para a ligação inicial do vírus às células da camada basal (Giroglou *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 1999).

HPVs de alto risco podem causar infecções latentes (não-produtivas) ou produtivas, de acordo com o seu ciclo celular. Nas infecções não-produtivas, lesões de baixo grau, o vírus é episomal, não se encontra integrado no DNA celular, e comporta-se como um plasmídeo independente da actividade celular. Nas infecções produtivas, algumas lesões de alto grau e cancro invasivo, o vírus é capaz de completar o seu ciclo de vida e a infecção é estendida às camadas supra-basais, onde o DNA viral é amplificado, as

proteínas do capsídeo expressas e as partículas virais maduras produzidas (Doorbar, 2005; Woodman *et al.*, 2007; Zur Hausen, 2002).

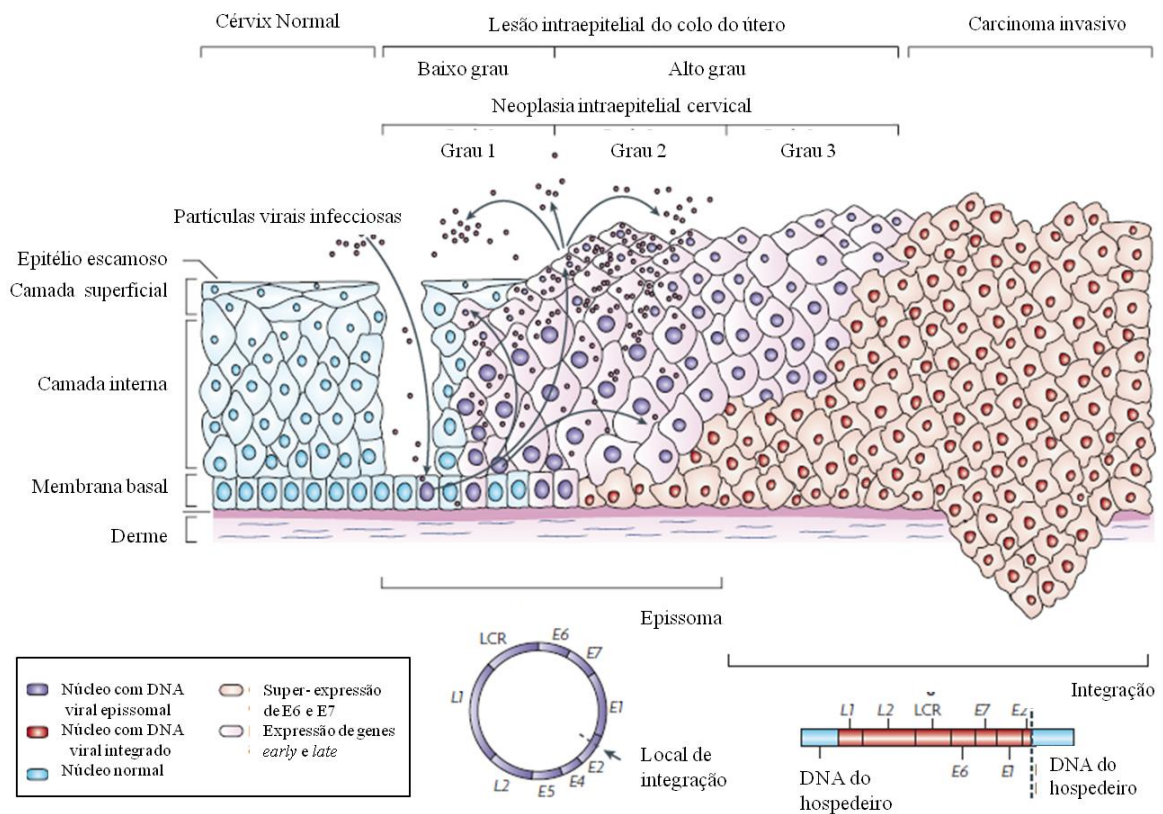
### 1.3. HPV e carcinogénese do colo uterino

O primeiro estudo sobre a pesquisa de DNA de HPV em cancro do colo do útero (CCU) foi realizado pelo prestigiado investigador, *Harald zur Hausen* (1974), Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina, em 2008. A partir desta data, várias experiências foram realizadas com a finalidade de avaliar o papel da infecção por HPV na etiologia do CCU.

Vários estudos mostram que os HPVs de alto risco estão presentes em 99% dos casos de CCU e têm a capacidade de integrar o DNA viral no genoma do hospedeiro, processo esse que é fundamental para a carcinogénese (Steben e Duarte-Franco, 2007). A forma viral integrada nas lesões de alto grau e cancro invasivo, contrariamente à forma episomal nas lesões de baixo grau, determina um pior prognóstico e resistência à terapia (Woodman *et al.*, 2007).

A maioria das infecções por HPV de alto risco regride espontaneamente e só uma pequena percentagem de casos, em que a infecção viral persiste, conduz ao desenvolvimento de lesão de baixo grau (LGSIL- *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) que se caracteriza pela anormal diferenciação no terço inferior do epitélio. Este tipo de lesão pode regredir ou evoluir para displasia severa (HGSIL- *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) atingindo o terço superior do epitélio pavimentoso do colo do útero. Em último caso, pode haver regressão ou evolução para carcinoma invasivo, caracterizado pela invasão do estroma pelas células neoplásicas e pela ruptura da camada basal (Snijders *et al.*, 2006; Woodman *et al.*, 2007) (Figura 2).

No CCU a integração do DNA viral acontece entre as *ORFs* E1 e E2, região com elevada instabilidade e designada de *Common Fragile Sites* (CFSs). Após a integração há ruptura e perda de material genético, incluindo a ruptura do gene E2, o que aumenta a capacidade de imortalização do vírus. Como consequência deixa de haver uma regulação negativa na expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 (Woodman *et al.*, 2007; Zur Hausen, 2002) (Figura 2).



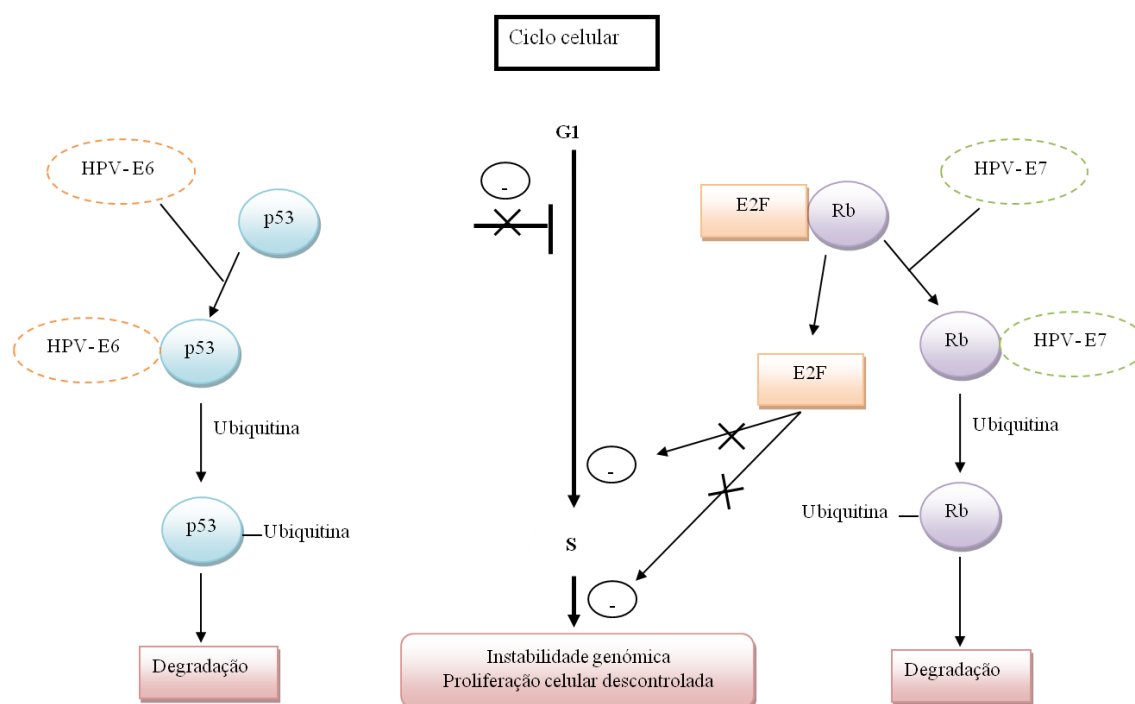
**Figura 2.** Representação do ciclo de vida do HPV, organização do genoma e sua integração no genoma do hospedeiro. Genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), genes tardios (L1 e L2) e região regulatória (LCR) (adaptado de Woodman *et al.*, 2007).

As proteínas E6 e E7 dos tipos oncogénicos, têm capacidade de promover a instabilidade genética das células do hospedeiro e degradar proteínas reguladoras do ciclo celular, como a proteína supressora tumoral p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente. Como consequência, ocorre desregulação e transformação celular dando origem a células oncogénicas (Santos *et al.*, 2005; Zheng e Baker, 2006; Zur Hausen, 2002).

A proteína E6 do HPV de alto risco tem a capacidade de inativar a p53 e recrutar proteínas celulares do complexo E6/p53 que vão reconhecer a proteína p53 como danificada e sinalizá-la para degradação pela via da ubiquitina-proteossoma (Santos *et al.*, 2005; Zur Hausen, 2002) (Figura 3).

Nos HPVs de baixo risco, a ligação da proteína E6 à p53 não origina a sua degradação, admitindo-se deste modo que nestes casos não contribui para a carcinogénese (Zheng e Baker, 2006).

A oncoproteína E7 interage com o complexo formado pela pRb e o factor de transcrição E2F, quebrando essa ligação e degradando a pRb. Este acontecimento resulta na libertação do factor E2F, que deixa de regular negativamente o ciclo celular da fase G1 para a S (Figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática da acção das proteínas E6 e E7 do HPV nas proteínas p53 e pRb (Retinoblastoma), respectivamente (adaptado de Zur Hausen, 2002).

#### 1.4. Classificação epidemiológica do HPV

Foram já identificados mais de 100 tipos de HPV em todo o mundo, sendo que cerca de 40 apresentam capacidade de infectar as mucosas anogenitais (Woodman *et al.*, 2007).

Para além da classificação filogenética, os HPVs são classificados de acordo com o seu potencial oncogénico, como tipos de baixo ou alto risco. Os tipos de HPV de baixo risco

estão principalmente associados a lesões benignas, como verrugas genitais (Zur Hausen, 2002). Contrariamente, os tipos de alto risco estão associados a lesões de alto grau que, em situações específicas, podem evoluir para cancro. Vários estudos epidemiológicos classificam os HPV's em quatro grupos (Munoz *et al.*, 2006; Nobre *et al.*, 2008):

- Alto Risco (HPV16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59);
- Provável Alto Risco (HPV26, 53, 66, 68,73, e 82);
- Baixo Risco (HPV6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89);
- Risco Indeterminado (HPV30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91).

### **1.5. Epidemiologia da infecção por HPV e Cancro do Colo do Útero**

A infecção genital por HPV é considerada como a infecção sexualmente transmissível mais comum em mulheres (Burchell *et al.*, 2006).

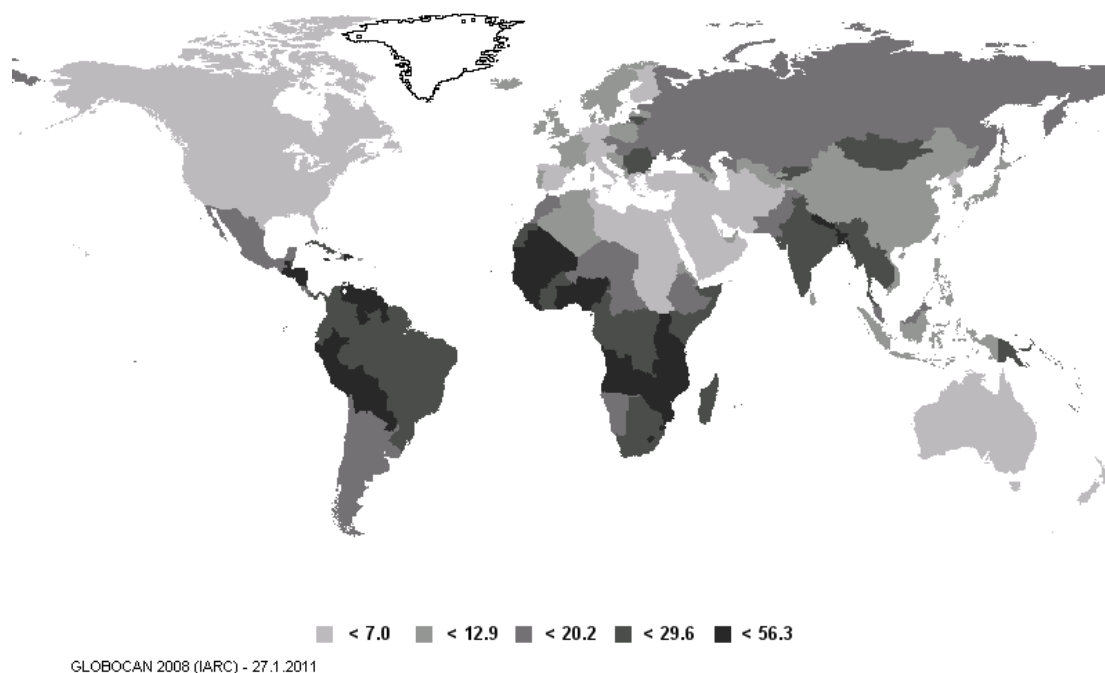
A infecção por este vírus deverá ocorrer num número elevado de mulheres, tipicamente logo após o início da actividade sexual e é mais prevalente em mulheres com menos de 34 anos de idade (De Sanjose *et al.*, 2007). Contudo, a infecção é resolvida espontaneamente na maioria das jovens, geralmente em 12-24 meses, pelo que somente uma pequena proporção de mulheres irá desenvolver uma infecção crónica (De Sanjose *et al.*, 2007; Moscicki *et al.*, 2001; Woodman *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de CCU é um processo lento e gradual, podendo levar 10 ou mais anos desde a infecção persistente até ao desenvolvimento de lesões precursoras tumorais e carcinoma invasivo (Snijders *et al.*, 2006).

A prevalência global da infecção por HPV em mulheres assintomáticas está compreendida entre 2 a 44%, com maior prevalência em mulheres com idade entre 20-24 anos (Trottier e Burchell, 2009; Trottier e Franco, 2006). Uma recente meta-análise refere que a prevalência global da infecção por HPV, em mulheres com citologia normal, foi estimada em 10.4% (95% intervalo de confiança, IC: 10.2-10.7%). A maior prevalência regista-se em África 22.1% (20.9-23.4), América Central 20.4% (19.3-21.4), seguindo-se a América do Norte 11.3% (10.6-12.1), Europa 8.1% (7.8-8.4) e Ásia 8.0% (7.5-8.4) (De Sanjose *et al.*, 2007).

Estima-se que no mundo, 291 milhões de mulheres sejam portadoras do HPV e que cerca de 105 milhões venham a adquirir uma infecção por HPV16 ou 18, pelo menos uma vez na vida (De Sanjose *et al.*, 2007).

Relativamente ao CCU, é a neoplasia ginecológica mais frequente em todo o mundo com cerca de 529 000 novos casos e 275 000 mortes em 2008. Esta neoplasia é um problema de saúde pública, sobretudo em países menos desenvolvidos, provavelmente pelo difícil acesso a cuidados de saúde e rastreio citológico através do teste de Papanicolaou. De acordo com dados recentes, as maiores taxas de incidência verificam-se no centro e sul da América, África oriental, sul e sudeste da Ásia (Ferlay *et al.*, 2010) (Figura 4).



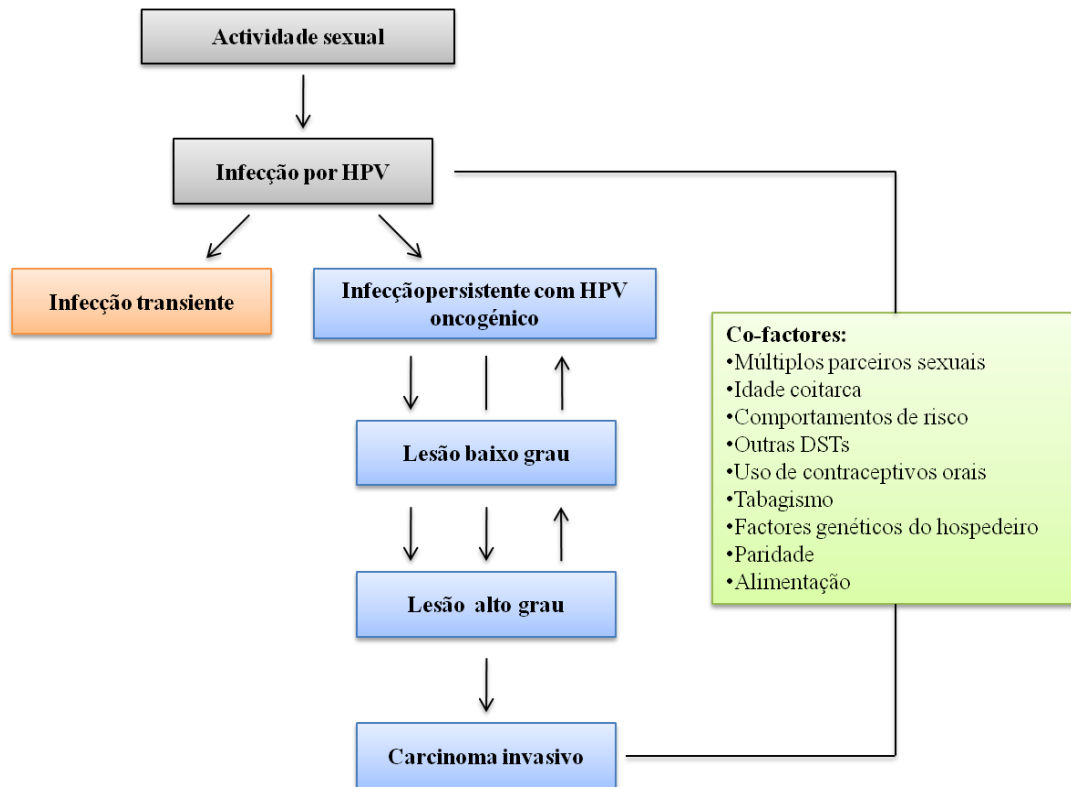
**Figura 4.** Incidência mundial de cancro do colo do útero por 100 000 mulheres de todas as idades, (adaptado de (GLOBOCAN, 2008)).

Em Portugal, são diagnosticados, anualmente, cerca de 956 novos casos e aproximadamente 378 morrem da doença. O CCU é o quarto tipo de cancro mais comum nas mulheres portuguesas e o segundo mais frequente em mulheres entre os 15 e os 44 anos de idade (Pinheiro *et al.*, 2003).

Em países com programas de rastreio organizado de CCU utilizando exames citológicos, verificou-se uma redução significativa na taxa de incidência e mortalidade, o que realça a importância da detecção precoce do HPV e outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como forma de prevenção (Peto *et al.*, 2004). No entanto, em Portugal não está implementado nenhum programa de rastreio organizado, com excepção da região centro de Portugal, com o teste de Papanicolaou, desde 1990 (ARS-Centro, 1990).

### **1.6. Factores de risco e infecção por HPV**

Vários estudos demonstram que a infecção persistente com HPV de alto risco constitui um factor necessário, contudo não suficiente para o desenvolvimento de CCU (Medeiros *et al.*, 2005; Zur Hausen, 2009). Na literatura estão ainda descritos outros factores de risco como: comportamentos sexuais de risco, múltiplos parceiros sexuais, idade de coitarca, paridade, uso de anticoncepcionais orais, tabagismo, alimentação, co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis, entre outros (Castellsague e Munoz, 2003; Franco *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2002; Paba *et al.*, 2008; Trottier e Franco, 2006; Winer *et al.*, 2003) (Figura 5).



**Figura 5.** Representação do modelo etiológico da infecção por HPV e cancro do colo uterino, ilustrando o possível papel de factores de risco na infecção persistente e evolução de lesões (adaptado de Franco *et al.*, 2001).

A persistência da infecção pelo HPV e carcinogénese de lesões cervicais tem sido associada a infecções concomitantes com *Chlamydia trachomatis*, Herpesvírus simples (HSV) e também com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Chen *et al.*, 2005; Stanley, 2009) em que a infecção induzida por estes agentes pode diminuir a capacidade de eliminação do HPV (Moscicki, 2005; Paba *et al.*, 2008; Silins *et al.*, 2005).

### 1.7. Método de auto-colheita cervico-vaginal

A citologia constitui uma útil ferramenta para o rastreio de CCU. No entanto, as práticas de rastreio convencionais que envolvem exame médico do tracto genital podem constituir um entrave ao diagnóstico de DST (Moscicki, 2003; Peto *et al.*, 2004).

O método de auto-colheita tem a vantagem de não exigir um exame espécuro-vaginal, reduzindo o desconforto que algumas mulheres sentem perante a examinação médica. Além disso, constitui um método alternativo viável para mulheres que se recusam a participar em programas de rastreio de base populacional e pode ser útil em populações com difícil acesso a cuidados de saúde (Kahn, 2004; Nobbenhuis *et al.*, 2002; Petignat *et al.*, 2007).

Actualmente, tem sido reconhecida a aplicabilidade do método de auto-colheita na detecção de HPV, *C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, entre outros microrganismos associados a patologias genitais (Hobbs *et al.*, 2008; Villa e Denny, 2006).

Estudos recentes mostram que as amostras colhidas pelo método de auto-colheita tem sensibilidade para detectar lesões de alto e baixo grau e cancro invasivo, sendo esta equivalente ou superior ao Teste de Papanicolaou (Petignat *et al.*, 2007). Por outro lado, a auto-colheita para detecção de DNA do HPV tem demonstrado uma correlação clinicamente semelhante com a colheita efectuada pelo clínico (Hobbs *et al.*, 2008; Petignat *et al.*, 2007; Villa e Denny, 2006).

A auto-colheita é um método adequado para a monitorização do HPV numa população. A junção deste tipo de colheita com os procedimentos de rotina permite que áreas de alto risco sejam identificadas, a fim de estabelecer as intervenções e realizar vigilância de rotina para avaliar o impacto das mesmas (por exemplo, vacinação profilática contra o HPV) ao longo do tempo (Ferrecio *et al.*, 2008).

### **1.8. Métodos de detecção do HPV e lesões do colo do útero**

Até ao momento, não é possível isolar o HPV em culturas celulares. Assim, a detecção do vírus depende da utilização de técnicas de microscopia, imunologia e biologia molecular.

O Teste de Papanicolaou é o procedimento mais utilizado para o rastreio de CCU e visa detectar alterações celulares por observação ao microscópio óptico de esfregaço de células esfoliativas do colo do útero. A introdução deste exame nos programas de rastreio de CCU permitiu uma redução nas taxas de incidência e mortalidade por esta

neoplasia. Para um programa de rastreio, é um teste rápido e de relativamente baixo custo. No entanto, o rastreio de CCU por este método pode falhar por vários motivos: ausência de um rastreio regular, baixa sensibilidade, bem como erros de interpretação do esfregaço (Kulasingam *et al.*, 2002).

Actualmente, existe uma nova versão do teste de Papanicolaou que consiste em colocar as células do colo do útero num meio líquido de conservação (*liquid-base cytology*). Esta técnica pode ser utilizada como teste adjuvante (por exemplo: teste de detecção do HPV) e apresenta maior rapidez de leitura. No entanto, alguns estudos mostraram ausência de associação estatística relativa à sensibilidade para a detecção de neoplasia intra-epitelial cervical de grau 2 (CIN II), ou superior, entre as duas versões de teste de Papanicolaou (Ronco *et al.*, 2007)

A avaliação microscópica do esfregaço baseia-se num diagnóstico subjectivo, devido à elevadas taxas de falsos positivos e negativos que podem ocorrer em ambas as técnicas. Um estudo realizado por Hildesheim e colaboradores, comprovou que 57% das mulheres com CCU apresentavam citologia normal nos cinco anos antes do diagnóstico (Hildesheim *et al.*, 1999).

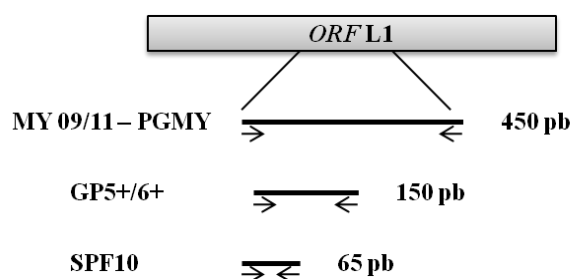
A detecção molecular do HPV tem sido implementada, em vários países como teste primário de rastreio de CCU, substituindo a citologia cérvico-vaginal, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (Salmeron *et al.*, 2003; Schiffman *et al.*, 2000). Esta opção deve-se ao facto de o teste de detecção molecular do HPV ter um alto valor preditivo negativo (Villa e Denny, 2006).

Actualmente, o único método comercialmente disponível para a detecção do DNA do HPV e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) é a Captura Híbrida II, *hc2* (*Digene, Gaithersburg, MD*, Estados Unidos da América). É um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos com amplificação do sinal, que utiliza a quimioluminescência de microplacas para a detecção de 13 tipos de HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e 5 tipos de HPV de baixo risco (HPV6, 11, 42, 43 e 44) (Villa e Denny, 2006).

A presença do genoma viral pode ser detectada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que permite a amplificação de pequenas quantidades de DNA e identificação de

diferentes tipos de HPV. É uma técnica com elevada sensibilidade e especificidade, pois permite a detecção de sequências específicas do DNA do HPV extraído de amostras biológicas (células ou tecidos) (Villa e Denny, 2006).

Os procedimentos laboratoriais de PCR de largo espectro permitem a detecção de vários tipos de HPV numa única reacção, utilizando *consensus primers*. Estes *primers* são geralmente direccionados para uma região do gene L1 do HPV mais conservada. Os conjuntos de *primers* mais frequentemente utilizados para detecção do DNA de HPV mucosotrópicos são: GP5+/GP6+ (De Roda Husman *et al.*, 1995), MY09/11 (Manos *et al.*, 1989), PGMY (Gravitt *et al.*, 2000) e SPF10. (Kleter *et al.*, 1999). Estes *primers* diferem nas sequências de *annealing* e tamanho do produto amplificado (Molijn *et al.*, 2005)(Figura 6).



**Figura 6.** Representação da *open reading frame* (ORF) L1 indicando a posição dos quatro conjuntos de *primers* mais utilizados na detecção do HPV (adaptado de Molijn *et al.*, 2005).

A detecção do DNA do HPV pode ser usada em variadas situações clínicas, particularmente em mulheres com mais de 30 anos, como um teste adjuvante para a citologia, para triagem de situações citológicas duvidosas, como por exemplo, no caso de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), ou no seguimento pós-tratamento. Em amostras cervicais obtidas por auto-colheita, também é possível a detecção do DNA do HPV, o que pode ser útil em mulheres não aderentes a programas de rastreio de infecções sexualmente transmissíveis e exames ginecológicos (Villa e Denny, 2006).

As infecções por HPV de alto risco são frequentemente detectadas e devido à sua natureza transitória, não apresentam risco aumentado para CCU. Todavia, se a infecção for persistente, o risco de desenvolver lesões de alto grau e mesmo neoplasia cervical aumenta consideravelmente (Woodman *et al.*, 2007). Desta forma, a genotipagem do HPV pode constituir uma ferramenta importante em programas de rastreio (Nobre *et al.*, 2008) e seguimento pós-tratamento (Wright *et al.*, 2007), identificando os tipos de HPV oncogénicos responsáveis por infecções persistentes e monitorização de novas vacinas profiláticas.

Na literatura surgem vários estudos centrados no desenvolvimento de testes de genotipagem que permitam a tipagem do HPV presente em diferentes amostras. A metodologia tem como base a amplificação de um fragmento da ORF L1 utilizando *consensus primers* (MY09/11, GP5 +/6 +, SPF10) e posterior genotipagem recorrendo a diferentes metodologias, tais como: sequenciação do *DNA*, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e *reverse hybridization* (Brink *et al.*, 2007).

A técnica de PCR-RFLP tem sido avaliada como uma metodologia sensível para detectar e caracterizar o HPV em amostras clínicas, aliada ao facto de ser financeiramente vantajosa é uma abordagem metodológica adequada para a detecção de HPV em programas de rastreio de CCU em países em desenvolvimento (Nobre *et al.*, 2008).

### **1.9. Estratégias educativas e profiláticas**

A infecção pelo HPV pode ser prevenida, de certa forma, ao adiar a idade de coitarca, limitar o número de parceiros sexuais e utilizar consistentemente e correctamente o preservativo. Estas medidas podem reduzir a taxa de transmissão mas não eliminar a possibilidade de aquisição da infecção por HPV.

Programas de rastreio em mulheres jovens são essenciais para entender não só a epidemiologia do HPV, mas também os comportamentos e as práticas da comunidade e, conseqüentemente, impedir a propagação da infecção. Os adolescentes devem ser educados sobre o HPV e factores de risco associados à infecção. Logo, devem também ser encorajados a obter cuidados ginecológicos adequados após o início da actividade

sexual. O teste de Papanicolaou constitui a principal forma da prevenção da infecção por HPV e cancro do colo do útero (Leung *et al.*, 2005; Moscicki, 2005).

Associada às estratégias educativas está a imunização com vacinas contra o HPV que a longo prazo, pode tornar-se numa solução promissora na redução a incidência de lesões pré-invasivas e CCU. A vacinação contra o HPV reduz o risco para neoplasia do colo uterino, contudo e por si só, não o elimina, uma vez que as vacinas não protegem contra todos os tipos de HPV (Franco e Cuzick, 2008).

As vacinas contra o HPV são constituídas por partículas “virus-like” (VLP) que expressam a proteína L1 do HPV (Leggatt e Frazer, 2007). As VLPs são semelhantes aos viriões do HPV, sem o material genético, logo não são infecciosas, mas imunogénicas (Stanley, 2009). Existem 2 tipos de vacinas: a bivalente, contra o HPV16 e 18, e a tetravalente, contra o HPV 6, 11, 16 e 18, conferindo protecção cruzada contra o HPV31, 33 e 45.

A vacina tetravalente *Gardasil*® (Merck Sharp & Dohme B. V.) está indicada como agente profilático de lesões genitais pré-neoplásicas (colo uterino, vulva e vagina), CCU e condiloma acuminado relacionados com HPV6, 11, 16 e 18, em adolescentes e mulheres jovens com idades compreendidas entre os 9 e 26 anos e em rapazes dos 9 aos 15 anos. Foi a primeira a ser comercializada mundialmente, inicialmente nos Estados Unidos da América e Canadá, seguindo-se a Austrália e a Europa. Em Portugal, *Gardasil*® é comercializada desde Dezembro de 2006 (INFARMED, 2006).

A vacina bivalente *Cervarix*® (GlaxoSmithKline Biological S.A.) está indicada na prevenção de lesões pré-neoplásicas do colo do útero, relacionadas com o HPV16 e 18, em adolescentes e mulheres jovens dos 10 aos 25 anos (INFARMED, 2007).

Em Portugal, a vacina tetravalente está integrada no Programa Nacional de Vacinação (Despacho n.º 8378/2008, de 20 de Março). São vacinadas as mulheres que atinjam 13 anos em cada ano a partir de 2008 e as que atinjam 17 anos em 2009, 2010 e 2011(DGS, 2008).

Vários estudos demonstram a eficácia da vacina tetravalente na protecção de lesões anogenitais induzidas pelo HPV6, 11, 16 e 18. Para uma maior eficácia das vacinas,

estas devem usadas antes de haver contacto com HPV e preferencialmente antes do início da actividade sexual. (Joura *et al.*, 2007).

## **2. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e seu papel como co-factor do HPV na carcinogénese cervical**

A extensa investigação sobre o HPV mostra que o este vírus é a causa principal de CCU, sendo que os tipos de HPV oncogénicos estão associados com um maior risco de doença. Sabe-se ainda que, apenas uma pequena proporção de mulheres infectadas com HPV progride para CCU (Woodman *et al.*, 2007; Zur Hausen, 2002).

A associação entre a infecção por HPV e o comportamento sexual tem motivado vários investigadores na pesquisa de agentes sexualmente transmissíveis que possam influenciar a história natural da infecção por HPV ao longo de todo o processo de persistência, progressão ou resolução da mesma (Castle e Giuliano, 2003; Zereu *et al.*, 2007). Um dos agentes mais estudado é a Clamídia, por ser o segundo agente de DST mais comum, e por estar também envolvida na inflamação cervical.

O interesse na infecção genital por *C. trachomatis* como um factor etiológico para CCU tem sido relacionado à sua natureza assintomática, persistência se não tratada, e indução de metaplasia e inflamação crónica (Smith *et al.*, 2002). Como exemplo, Clamídia é uma causa bem conhecida de cervicite. A resposta inflamatória está associada à produção de radicais livres, que desempenham um papel crucial na iniciação e progressão tumoral. Estas substâncias causam danos no DNA e proteínas de reparação do DNA, inibindo a apoptose, e permitindo o desenvolvimento de instabilidade genética (Palmer e Paulson, 1997). As células inflamatórias produzem citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos e de crescimento que podem promover o crescimento tumoral (Smith *et al.*, 2002).

Os primeiros relatos sobre a infecção por HPV e *C. trachomatis* e a sua relação com o CCU foram publicados na década de 70. As observações clínicas indicaram que a infecção genital por *C. trachomatis* estava associada com atipia cervical (Puolakkainen *et al.*, 1989) e neoplasia cervical (Schachter *et al.*, 1975). Um estudo realizado por Rasmussen e colaboradores, com linhas celulares de carcinoma cervical infectadas com

*C. trachomatis*, permitiu concluir que estas produziam mais citocinas pró-inflamatórias do que as células primárias não infectadas, sugerindo que a co-infecção por HPV e *C. trachomatis* no tecido do colo do útero pode resultar num estado inflamatório mais pronunciado (Rasmussen *et al.*, 1997). Alguns autores sugerem que a infecção por *C. trachomatis* é um factor predisponente para infecção subsequente com HPV, ou vice-versa (Silins *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002), dado que a forma de transmissão (sexual) é semelhante.

Até à actualidade, foram realizados estudos a partir de avaliações serológicas e testes de biologia molecular, que encontraram uma associação positiva entre o sinergismo do HPV e *C. trachomatis* para lesões pré-neoplásicas e/ou CCU (Anttila *et al.*, 2001; Moscicki, 2005; Paba *et al.*, 2008; Silins *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 2002). No entanto, há estudos que mostraram resultados contraditórios (Castle *et al.*, 2003; Castellsague *et al.*, 2006; Reesink-Peters *et al.*, 2001; Zereu *et al.*, 2007). Conclui-se, portanto, que mais estudos são necessários para esclarecer o significado de *C. trachomatis* como co-factor na carcinogénese do colo uterino, provocado por HPV.

### 3. *Chlamydia trachomatis*

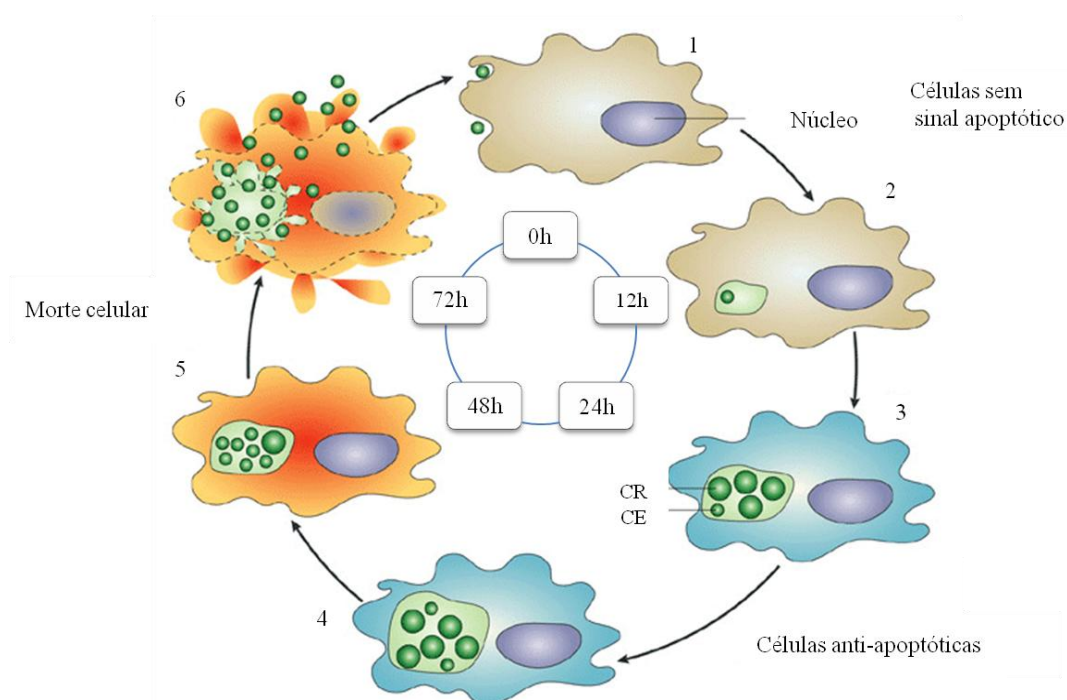
Inicialmente, *Chlamydia trachomatis* foi considerada um vírus, devido à sua condição de parasita intracelular obrigatório e às suas pequenas dimensões. Taxonomicamente, pertence à ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae* e ao género *Chlamydia*. É uma bactéria de Gram-negativo, desprovida de peptidoglicano e incapaz de ser cultivada nos meios normalmente utilizados para o isolamento de bactérias (Cevenini *et al.*, 2002).

*C. trachomatis* tem vários serótipos baseados na sua constituição antigénica. Os serótipos A, B e C são responsáveis pelo tracoma. Os serótipos D a K são predominantemente isolados do trato urogenital, associados a doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), conjuntivites e pneumonia neonatal. Os serótipos L são associados ao linfogranuloma *venereum* (Cevenini *et al.*, 2002; Manavi, 2006).

### 3.1 Infecção e patogénese

Actualmente, sabe-se que este patogénio é totalmente dependente da célula hospedeira para a produção de adenosina trifosfato (ATP) e a sua multiplicação induz a morte celular, pois possui polimorfismo integrado num ciclo de vida (Byrne e Ojcius, 2004).

No ciclo de vida, os corpos elementares (CEs), são elemento infectante (células do epitélio colunar e macrófagos) e forma de resistência (200-300 nm de diâmetro). Os corpos reticulares (CRs), são metabolicamente activos (1000-1500 nm) e representam a forma de multiplicação intracelular, por divisão binária, que evolui progressivamente para a forma infectante, CEs (Byrne e Ojcius, 2004; Manavi, 2006) (Figura 7).



**Figura 7.** Representação do ciclo de multiplicação. A infecção produtiva envolve: invasão das células do hospedeiro (1,2); diferenciação dos corpos elementares (CEs) em corpos reticulares (CRs) (3); crescimento e divisão intracelular dos CRs (4); diferenciação dos CRs em CEs e evasão às células do hospedeiro (5,6) (adaptado de Byrne e Ojcius, 2004).

Esta multiplicação processa-se nos vacúolos endocíticos que leva a fusão com os lisossomas, resultando uma inclusão citoplasmática justa-nuclear, idêntica a inclusões

virais. Os CEs provocam a lise celular, iniciando um novo ciclo biológico (Byrne e Ojcius, 2004; Manavi, 2006) .

### **3.2. Epidemiologia da infecção**

Clamídia é a infecção bacteriana sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo. Muitas destas infecções são assintomáticas e se não tratadas, podem levar a complicações mais severas (Bebear e De Barbeyrac, 2009).

*C. trachomatis* é transmitida preferencialmente por contacto sexual (risco de transmissão de 40-60%) e no caso de recém-nascidos, por transmissão vertical (taxa de transmissão aproximadamente 50%) (Norman, 2002).

Nos Estados Unidos da América, em 2009, foram reportados ao *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC), mais de um milhão de casos de infecções por Clamídia, correspondendo a uma taxa de prevalência de 409.2 casos por 100 000 habitantes. Na Europa, a incidência da infecção tem vindo a aumentar nos últimos 10 anos (CDC, 2010). Os avanços nas técnicas de diagnóstico e métodos de colheita de amostras têm facilitado a detecção, tratamento e prevenção destas infecções importantes ao nível da saúde pública global. Em 2008, mais de 300 000 casos de infecção por Clamídia foram reportados em 23 países Europeus, com uma taxa de 150/100 000 (ECDC, 2010). Na Europa, a prevalência de infecção pode variar de 1.7 a 17%, em mulheres a assintomáticas (Wilson *et al.*, 2002; Bebear e De Barbeyrac, 2009). Relativamente a Portugal, os dados são escassos, sendo que, a última referência da OMS revela que a taxa de incidência em 2005 foi de 1.4/100 000 (WHO, 2005). Supõe-se que a verdadeira incidência da infecção por Clamídia seja superior, dado a doença ser subnotificada, por ser uma infecção, na maioria dos casos, assintomática.

### 3.3. Factores de risco

As infecções por Clamídia, à semelhança das restantes DSTs, são tanto mais frequentes, quanto mais promíscuo for o indivíduo, registando-se principalmente em adolescentes e adultos jovens. Tem sido descrita na literatura a importância de vários factores na patogénese bacteriana. A iniciação precoce da actividade sexual, o uso precoce de anticoncepcionais orais, que promovem a “ectopia” cervical e favorecem a aderência de Clamídia às células do hospedeiro e a ausência de sintomatologia, contribuem para que a infecção seja adquirida logo nas primeiras relações sexuais, com parceiros que a maior parte das vezes aparentam ser saudáveis. Comportamentos de risco, relações sexuais não protegidas, múltiplos parceiros sexuais e idade inferior a 25 anos, constituem factores de risco para a infecção por *C. trachomatis* (Norman, 2002; Manavi, 2006)

### 3.4. Manifestações clínicas

*C. trachomatis* é o principal agente etiológico de uretrites não gonocócicas e pós-gonocócicas. Na mulher, pode complicar-se com cervicite, endometrite, salpingite, peritonite pélvica, doença inflamatória pélvica (PID), síndrome de Fitz-Hugh-Curtis e bartolinite. No homem, a infecção pode manifestar-se como epididimite, prostatite e orquite (Manavi, 2006; Bebear e De Barbeyrac, 2009).

Um dos desafios no diagnóstico da infecção por clamídia é que pelo menos 50% dos homens infectados e 70% das mulheres infectadas não apresentam sintomatologia. Nas infecções sintomáticas, o período de incubação pode ir de 7 a 21 dias. A sintomatologia, na mulher, inclui disúria, descarga vaginal anormal, hemorragia, desconforto abdominal e ectopia. No homem, descarga uretral, prurido e disúria (Manavi, 2006).

A confirmação experimental revela que as infecções por *C. trachomatis* não tratadas levam em 60% dos casos a PID (Bebear e De Barbeyrac, 2009). Outros microrganismos estão associados a esta doença: *Neisseriae gonorrhoeae*, bacilos entéricos de Gram-negativo, *Streptococcus agalactiae*, Citomegalovírus (CMV), *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. As sequelas reprodutivas são também uma consequência, no que respeita a esterilidade (feminina e masculina), gravidez ectópica, parto prematuro e morte neo-fetal (Manavi, 2006).

Em adultos de ambos os sexos, a infecção por esta bactéria pode originar conjuntivite folicular, síndrome de Reiter e faringite e, no recém-nascido, pneumonia, otite, e conjuntivite neonatal. O linfogranuloma venéreo (LGV) é outra das formas de manifestação de infecção genital por *C. trachomatis*, que se caracteriza pela infecção de tecido linfático. Casos persistentes de LGV podem contribuir para a transmissão do HIV, pelo que se destaca a importância da necessidade de detectar e controlar a infecção (Bebear e De Barbeyrac, 2009).

### 3.5. Métodos de detecção de *Chlamydia trachomatis*

A identificação da presença de *C. trachomatis* pode ser realizada por vários métodos, culturais e não-culturais.

A cultura celular (células MacCoy, HeLa 229) é considerada o método *gold standard*, pois apresenta uma elevada especificidade (aproximadamente 100%). A forma infectante (CEs) é detectada por cultura celular, em que as células infectadas desenvolvem corpos de inclusão citoplasmáticos após 48 a 72 horas de incubação a 37°C. Os corpos de inclusão contêm um grande número de corpos elementares e reticulares, que podem ser detectados por técnicas de imunofluorescência. As desvantagens da cultura celular incluem uma sensibilidade de 80 a 85%, e devido à sua complexidade não é efectuada por rotina da maior parte dos laboratórios (Bebear e De Barbeyrac, 2009; Manavi, 2006).

Os métodos não culturais incluem a detecção antigénica por dois métodos: imunofluorescência directa (DFA) e ensaio imunoenzimático (EIA), e testes de biologia molecular. A DFA baseia-se na visualização directa dos CEs de *C. trachomatis*, através da ligação de anticorpos monoclonais anti-MOMP (maior proteína da membrana externa). É um método com elevada especificidade. No entanto, não é apropriado para grandes quantidades de amostra, porque é demorado e trabalhoso. A DFA tem uma sensibilidade de 75 a 80% e especificidade de 99%, comparativamente à cultura celular (Bebear e De Barbeyrac, 2009; Manavi, 2006). O EIA utiliza anticorpos marcados com uma enzima anti- lipopolissacarídeo (LPS) da membrana dos CEs. Uma vez que os anticorpos de outras espécies de Clamídia reagem de forma cruzada, este método pode

originar falso-positivos, apresentando menor especificidade. O EIA é um método menos sensível (75-80%) quando comparado com a cultura celular (Bebear e De Barbeyrac, 2009; Manavi, 2006).

A hibridização de ácidos nucleicos através de sondas de DNA (*DNA probing*) e RNA (*Hybrid capture*) permitiu uma melhor sensibilidade (75-90%) e especificidade (aproximadamente 99%) comparativamente à detecção antigénica e culturas celulares (Bebear e De Barbeyrac, 2009; Manavi, 2006).

O advento dos testes de amplificação de ácidos nucleicos revolucionou o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*. Estes ensaios permitem amplificar e detectar sequências de ácidos nucleicos específicas de *C. trachomatis* e têm uma sensibilidade superior a 95% e especificidade de 99%. É um método vantajoso para diagnóstico devido à capacidade de produzir resultados fiáveis com amostras não-invasivas, tais como amostras de urina e de auto-colheita cervico-vaginal, constituindo uma alternativa viável para programas de rastreio de DSTs (Jensen *et al.*, 2004; Manavi, 2006).

## II. OBJECTIVOS

### Objectivo geral

Determinar a prevalência da infecção por HPV e *Chlamydia trachomatis* em jovens no Norte de Portugal, utilizando o método de auto-colheita cervico-vaginal.

### Objectivos específicos

- Determinar a prevalência do HPV e *C. trachomatis*;
- Caracterizar a frequência dos vários genótipos de HPV;
- Relacionar a presença do HPV e *C. trachomatis* com informação clínica obtida por questionário;
- Determinar a ocorrência de co-infecções pelos agentes em estudo.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1. Aspectos éticos**

O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa, tendo sido seguidas as recomendações da Declaração de Helsínquia para a elaboração de projectos de investigação.

#### **2. População em estudo**

Entre Março e Maio de 2010, mulheres jovens da Região Norte de Portugal com idade compreendida entre os 14 e 30 anos foram convidadas a participar no estudo. Todas as participantes foram voluntárias e previamente informadas sobre o estudo através de *Workshops*, tendo sido dada especial relevância ao objectivo do estudo e explicação do método de colheita das amostras (auto-colheita). Como forma de minimizar diferenças socioeconómicas, foram incluídas estudantes que frequentavam o ensino básico, secundário e universitário público e privado.

A inclusão das participantes no estudo foi efectuada após consentimento informado prévio, de acordo com os procedimentos éticos. No caso das participantes menores de 18 anos, o consentimento informado foi assinado pelos pais / encarregados de educação, em conformidade com a legislação Portuguesa.

A confidencialidade dos resultados foi assegurada em todas as situações. Cada amostra foi processada com numeração atribuída por um processo aleatório, e o número da amostra e inquérito correspondente só foi conhecido pela própria participante (Anexo I).

Como critérios de inclusão: indivíduos do sexo feminino, presença de células viáveis na amostra e presença de DNA após extracção confirmada por PCR para o gene de referência, a cada amostra- inquérito correspondente. Foram excluídas dos estudos as participantes grávidas, amostras com presença de hemorragia e/ou coágulos, amostras mal acondicionadas, mau registo/identificação das amostras. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra abrangia 435 mulheres, com idade compreendida entre os 14 e os 30 anos.

### 3. Colheita da amostra (Método de auto-colheita)

As células esfoliativas do colo do útero foram obtidas por auto-colheita, utilizando o *kit* comercial *Universal Collection Medium* (UCM) da Digene (São Paulo, Brasil), que contém uma escova estéril e um tubo cónico com meio de transporte para estabilizar a amostra (Figura 8).



**Figura 8.** Representação do *kit* comercial *Universal Collection Medium* (UCM) da Digene (São Paulo, Brasil) para colheita de células do colo do útero (Adaptado de (Labpec, 2007)).

De acordo com o fabricante e seguindo as instruções do *kit*, o processo de auto-colheita consiste em inserir a escova no canal cervical, até que esta toque na região do colo do útero e, de seguida, rodá-la cinco vezes na mesma direcção, retirar, colocar no tubo e homogeneizar (Figura 9).



**Figura 9.** Representação esquemática do processo de auto-colheita (Adaptado de (Labpec, 2007)).

## **4. Procedimentos laboratoriais**

### **4.1. Processamento das amostras**

As amostras cervicais recolhidas foram mantidas a 4°C até ao seu processamento. Para a lavagem das escovas adicionou-se 5mL de tampão fosfato (PBS) e centrifugou-se 15min a 4500rpm; de seguida rejeitou-se o sobrenadante e suspendeu-se em 2mL de tampão PBS. Uma alíquota de 1ml foi concentrada em 200µL de PBS para posterior extracção de ácidos nucleicos.

### **4.2. Isolamento de ácidos nucleicos**

Procedeu-se à extracção de DNA das amostras cervicais com o kit comercial *QiAamp DNA Blood mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, 2010).

### **4.3. Quantificação de DNA**

Após a extracção, a presença de DNA foi avaliada através da quantificação da Densidade Óptica (DO) utilizando um espectrofotómetro UV/Visível, Nanodrop (*ND-1000, Nanodrop Technologies*), a partir de 2µL de amostra. A avaliação da quantidade e da qualidade deve ser executada a vários comprimentos de onda: 260nm (para avaliar especificamente para ácidos nucleicos) e 280nm (para avaliar presença de proteínas). A sua pureza foi avaliada através do rácio dos valores de absorvância a 260/280nm, em que uma razão maior que 1,8 é geralmente considerada um indicador de qualidade aceitável do DNA.

### **4.4. Polymerase Chain Reaction**

Foram incluídos controlos negativos e positivos em todas as reacções de PCR: para o controlo negativo, substituiu-se o DNA de amostra por água bidestilada estéril (ddH<sub>2</sub>O); o controlo positivo para o HPV consistiu numa amostra de raspagem do colo do útero

com HPV de alto risco detectado por diagnóstico com o kit *hc2 High-Risk HPV DNA test* (Qiagen, Hilden, Alemanha). O controlo positivo para *C. trachomatis* corresponde a um isolado clínico, cedido pelo serviço de Virologia do Instituto Português de Oncologia do Porto.

As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador programável *Bio-Rad MyCycler*<sup>TM</sup> (*Bio-Rad, Hercules*, Estados Unidos de América) num volume total de 50 µL.

#### 4.4.1. Controlo do método de extracção de DNA

Para testar a eficácia método de colheita e extracção de DNA, foi pesquisada a presença do gene de referência, beta globina, pela técnica da PCR, de modo a obter um fragmento de 175 pares de base (pb), com os primers PCO<sub>3</sub> e BGII (Tabela 2). A reacção de amplificação continha 10 ng de DNA, 1U Taq DNA Polimerase (*MBI Fermentas*, #EP0402) e o respectivo tampão de reacção 1X, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (*MBI Fermentas*), 0.2 mM de dinucleosídeos trifosfatados (dNTPs) (*MBI Fermentas*, #R0192) e 0.3 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram as seguintes: pré-desnaturação durante 3min a 95°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 55°C e 1min a 72°C, com um passo de extensão final de 10min a 72°C.

#### 4.4.2. Detecção de DNA do HPV

A presença de DNA viral foi avaliada com recurso à técnica da PCR, utilizando os *primers* GP5+/6+ e os *primers* degenerados MY09/11 (Tabela 2), que amplificam uma região relativamente estável do gene L1 do HPV com 150 e 450 pb, respectivamente.

A reacção com os *primers* MY09/11 continha 10 ng de DNA, 1U Taq DNA Polimerase (*MBI Fermentas*, #EP0402) e o respectivo tampão de reacção 1X, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (*MBI Fermentas*), 0.2 mM de dNTPs (*MBI Fermentas*, #R0192) e 0.4 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram as seguintes: pré-desnaturação durante 3min a 95°C; 40 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C e 1min a 72°C, com um passo de extensão final de 5min a 72°C.

A reacção com os *primers* GP5+/6+ (Tabela 2) continha 10 ng de DNA, 1U Taq DNA Polimerase (MBI Fermentas, #EP0402) e o respectivo tampão de reacção 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas), 0.2 mM de dNTPs (MBI Fermentas, #R0192) e 0.4 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram as seguintes: pré-desnaturação durante 4min a 95°C; 40 ciclos de 30s a 94°C, 1min a 44°C e 1.30min a 72°C, com um passo de extensão final de 10min a 72°C.

#### 4.4.3. Detecção de DNA de *Chlamydia trachomatis*

A presença de DNA bacteriano foi avaliada com recurso à técnica da PCR, utilizando os *primers* CP24/27 (Tabela 2), que amplificam uma região com 207 pb do plamídeo críptico da *C. trachomatis*. A reacção continha 10 ng de DNA, 1U Taq DNA Polimerase (Promega, Flexi DNA Polymerase, #M8305) e o respectivo tampão de reacção 1X, 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.2 mM de dNTPs (MBI Fermentas, #R0192) e 0.3 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram as seguintes: pré-desnaturação durante 4min a 95°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 30s a 55°C e 1min a 72°C, com um passo de extensão final de 10min a 72°C.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* utilizados

Sequência dos <i>primers</i>		
<b>Beta globina</b>	PCO <sub>3</sub>	5'-ACA CAA CTG TGT TCA TAG C-3'
	BGII	5'-GTC TCC TTA AAC CTG TCT TG-3'
<b>HPV</b>	MY 09	5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'
	MY11	5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'
	GP5+	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'
	GP6+	5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-'
<b><i>C. trachomatis</i></b>	CP24	5'- GGG ATT CCT GTA ACA ACA AGT CAG G- 3'
	CP27	5'- CCT CTT CCC CAG AAC AAT AAG AAC AC- 3'

A =Adenina, T= Timina, G= Guanina e C= Citosina. Os *primers* MY09/11 são degenerados e usam nucleótidos modificados, em que M=A ou C, R=A ou G, W=A ou T e Y=C ou T.

### Electroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados

De modo a verificar a amplificação dos fragmentos de DNA, 15 µL dos produtos obtidos na PCR foram analisados por electroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), corados com brometo de etídeo. Em seguida, os géis foram visualizados, utilizando um transiluminador (*Quantity one, Bio-Rad*) de luz ultra-violeta e com o suporte do programa informático.

#### **4.5. Genotipagem do HPV por RFLP**

As amostras positivas por PCR com os *primers* MY09/11 foram genotipadas pelo método RFLP, conforme o descrito por Nobre e colaboradores (Nobre *et al.*, 2008). Este método permite a diferenciação dos vários genótipos do HPV, pela análise de clivagem do DNA.

Os genótipos do HPV divididos em quatro grupos baseados na sua actividade oncogénica: HPV de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), HPV de provável alto risco (26, 53, 66, 68, 73, 82), HPV de baixo risco (6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 70, 72, 81 e 89) e HPV de risco indeterminado (30, 32, 34 e 64, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 97, 102 e 106) (Munoz *et al.*, 2006; Nobre *et al.*, 2008).

Cerca de 5 µL dos produtos de PCR foram submetidos a digestão em quatro reacções independentes, num volume total de 20 µL, que continha, 2µL de 10X de tampão de cada enzima e 10U das seguintes enzimas de restrição: PstI (*New England BioLabs*, R0140S), HaeIII (*MBI Fermentas*, #ER0151), DdeI (*New England BioLabs*, R0175L) e RsaI (*New England BioLabs*, R0167S). As digestões ocorreram durante 5 horas a 37°C.

### Electroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por RFLP

Os fragmentos obtidos por RFLP foram analisados por electroforese em géis de agarose a 3% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta. A

identificação dos tipos de HPV foi feita seguindo o algoritmo proposto por Nobre *et al.* (2008).

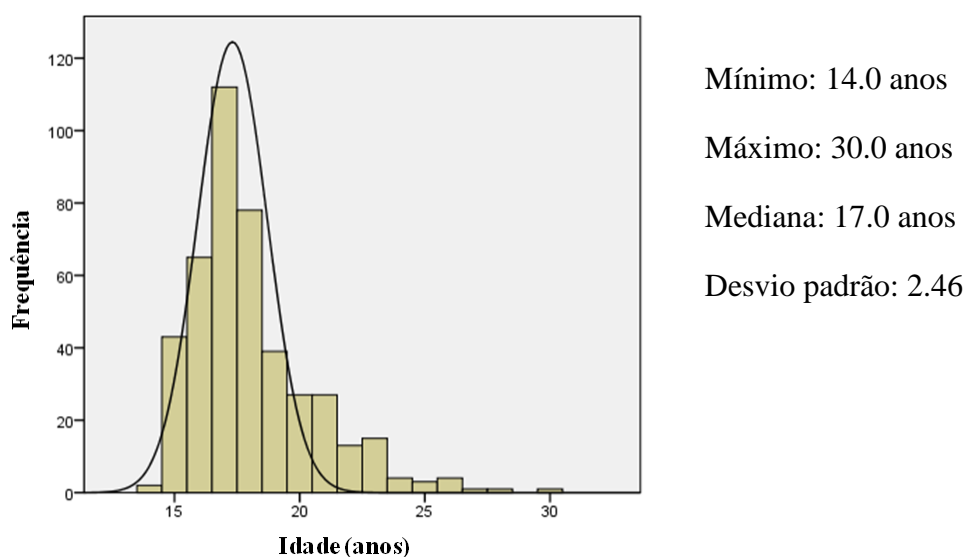
## **5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão para *Windows 18.0*. O teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para comparar as frequências entre os grupos. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0.05. O quociente *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança 95% (IC 95%) foram calculados como uma medida da associação entre as variáveis categóricas (idade mediana, idade mediana da menarca, idade mediana da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, número de anos de actividade sexual, contraceção, hábitos tabágicos, nível de ensino e vacinação contra o HPV).

## IV. RESULTADOS

### 1. Caracterização da população em estudo

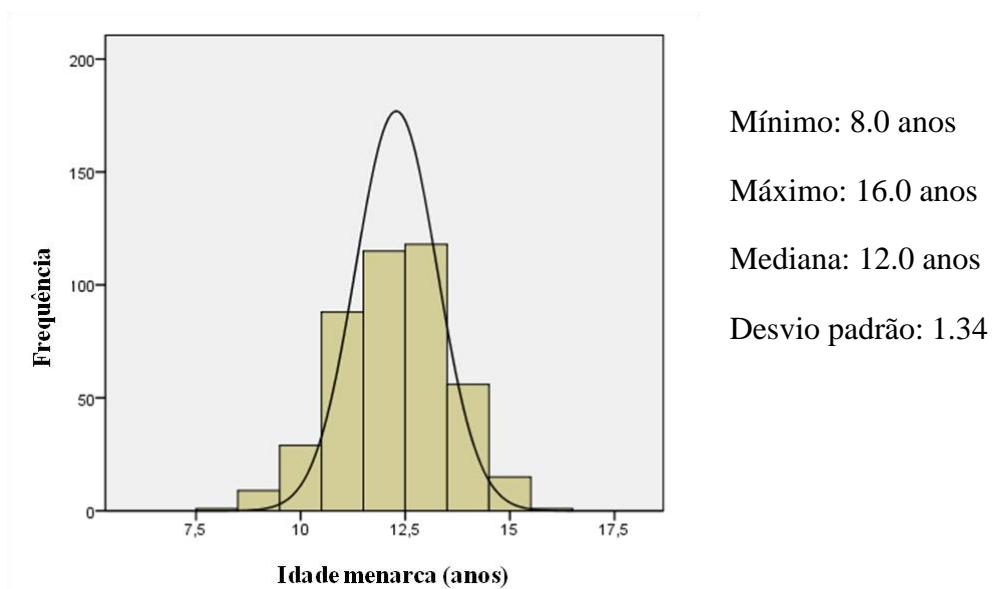
Neste estudo foram incluídas 435 mulheres, com idades compreendidas entre os 14 e 30 anos, sendo a idade mediana de 17.0 anos e o desvio padrão de 2.46 anos (Figura 10 e Tabela 3). A figura 10 mostra que a distribuição da idade é assimétrica à esquerda e indica que a maioria das estudantes tinha entre 15 e 20 anos.



**Figura 10.** Frequência de distribuição da idade.

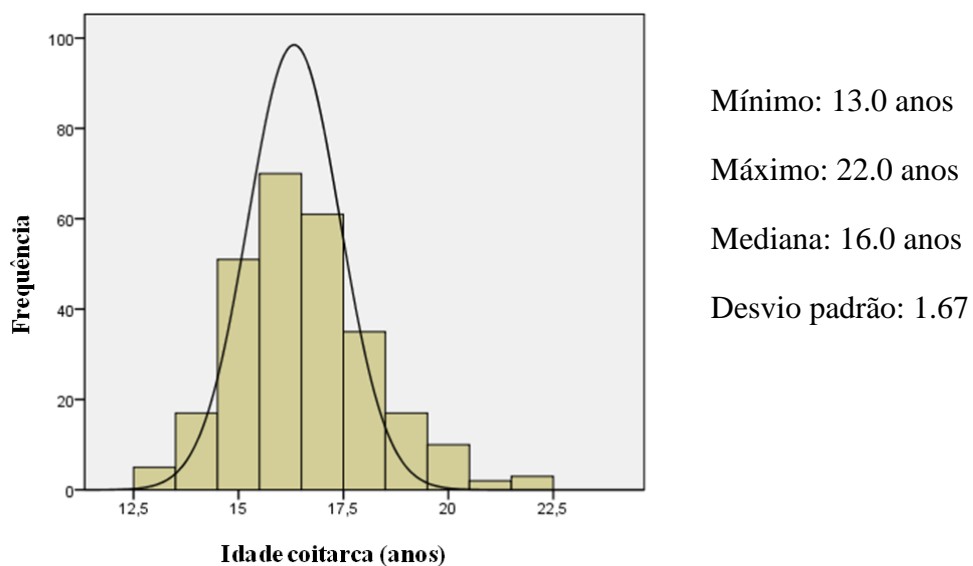
A população em estudo foi ainda caracterizada de acordo com a idade mediana de menarca e coitarca (Figura 11 e 12 respectivamente e Tabela 3).

De acordo com a figura 11, a maioria das participantes tinha uma idade de menarca entre 8 e 16 anos, apresentando uma distribuição normal.



**Figura 11.** Frequência de distribuição da idade de menarca.

A idade de coitarca da maioria das estudantes variou de 13 a 22 anos, estando a sua frequência representada na figura 12 e tabela 3.



**Figura 12.** Frequência de distribuição da idade de coitarca.

A amostra foi ainda caracterizada em função do nível de ensino, hábitos tabágicos, actividade sexual, número de parceiros sexuais, história de doenças sexualmente transmissíveis (DST), contraceção e vacinação (Tabela 3).

**Tabela 3.** Caracterização da população em estudo

<b>Idade e actividade sexual</b>	
Idade (mediana $\pm$ dp)	17.0 $\pm$ 2.46 (14-30)
Idade de menarca (mediana $\pm$ dp)	12.0 $\pm$ 1.34 (8-16)
Idade de coitarca (mediana $\pm$ dp)	16.0 $\pm$ 1.67 (13-22)
Número de anos de actividade sexual (mediana $\pm$ dp)	2.0 $\pm$ 2.06 (0-12)
<b>Nível de ensino (n=434)</b>	
Pré-universitário	323 (74.4)
Universitário	111 (25.6)
<b>Hábitos tabágicos (n=435)</b>	
Fumadora	62 (14.3)
Não-fumadora	317 (72.9)
NR	56 (12.9)
<b>Vacinação contra o HPV (n=435)</b>	
Sim	161 (37.0)
Não	231 (53.1)
NR	43 (9.9)
<b>Contraceção (n=435)</b>	
Sim	285 (65.5)
Não	89 (20.5)
NR	61 (14.0)
<b>Tipo de contraceção</b>	
Pílula	106 (24.4)
Preservativo	100 (23.0)
Pílula e preservativo	79 (18.2)
NR	150 (34.5)
<b>Actividade Sexual (n=435)</b>	
Sim	277 (63.7)
Não	38 (8.7)
NR	120 (27.6)
<b>Nº Parceiros Sexuais (n=277)</b>	
1	174 (62.8)
2-5	94 (33.9)
NR	9 (3.2)
<b>História de DST (n=435)</b>	
Sim	12 (2.8)
Não	423 (97.8)

dp, Desvio padrão; NR, Não Responde.

## 2. Distribuição do HPV

Da totalidade das amostras analisadas, 11.5% (n=50) foram positivas para HPV. Os casos positivos incluíram um caso de uma mulher que referiu não ter iniciado a actividade sexual e três casos para os quais não havia informação relativamente ao ter iniciado ou não a actividade sexual.

Para a análise dos resultados foram consideradas as mulheres que referiram ter iniciado a actividade sexual (n=277) com uma prevalência de HPV de 16.6 % (46/277) (Tabela 4).

A presença de HPV foi correlacionada com a idade mediana, idade mediana da menarca, idade mediana da coitarca, contraceção, hábitos tabágicos, número de parceiros sexuais, número de anos de actividade sexual, nível educacional e vacinação contra o HPV (Tabela 4).

Pela estratificação de acordo com o nível de ensino, o HPV foi mais frequente nas estudantes universitárias (24.0%) em comparação com as pré-universitárias (12.8%) (Tabela 4).

Ao comparar a frequência de HPV com o número de parceiros sexuais, observou-se um aumento da frequência nas mulheres com 2-5 parceiros sexuais (29.8%) e que iniciaram a actividade sexual há mais de 2 anos (25.6%) (Tabela 4).

De acordo com a tabela 4, a frequência de HPV nas estudantes que referiram não ter história de DST foi de 16.5% (n=44). Verificou-se que no grupo das estudantes pré-universitárias, 47.9% (11/23) foram positivas para HPV de alto risco, 17.4% (4/23) para HPV de provável alto risco e baixo risco, 8.7% (2/23) para HPV de risco indeterminado e em 21.7% (5/23) não foi possível identificar o genótipo presente. Nas estudantes universitárias foram avaliados 34.8% (8/23) casos de HPVs de alto risco, 13.0% (3/23) provável alto risco, 30.4% (7/23) baixo risco e 21.7% (5/23) de risco indeterminado (Tabela 4).

**Tabela 4.** Frequência de HPV nas mulheres sexualmente activas

	<b>HPV Positivo</b>	<b>HPV AR</b>	<b>HPV pAR</b>	<b>HPV BR</b>	<b>HPV RI</b>	<b>INC</b>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Total (n=277)</b>	46 (16.6)	19 (41.3)	7 (15.2)	8 (17.4)	7 (15.2)	5 (10.9)
<b>Idade (n=277)</b>						
≤17 (n=107)	8 (7.5)	6/8 (75.0)	----	----	1/8 (12.5)	1/8 (12.5)
18-20 (n=104)	19 (18.3)	6/19 (31.6)	3/19 (15.8)	3/19(15.8)	4/19 (21.0)	3/19 (15.8)
>20 (n=66)	19 (28.8)	7/19 (36.9)	4/19 (21.1)	5/19 (26.3)	2/19 (10.5)	1/19 (5.3)
≤17 (n=107)	8 (7.5)	6/8 (75.0)	----	1/2 (50.0)	1/8 (12.5)	1/8 (12.5)
>17 (n=161)	38 (22.4)	13/38 (34.2)	7/38 (18.4)	8/38 (21.1)	6/38 (15.8)	4/38 (10.5)
<b>Idade de menarca (n=275)</b>						
≤12 (n=151)	26 (17.2)	9/26 (34.6)	5/26 (19.2)	4/26 (15.4)	5/26 (19.2)	3/26 (11.5)
>12 (n=124)	20 (16.1)	10/20 (50.0)	2/20 (10.0)	4/20 (20.0)	2/20 (10.0)	2/20 (10.0)
<b>Idade de coitarca (n=271)</b>						
≤16 (n=143)	22 (15.4)	10/22 (45.4)	4/22 (18.2)	2/22 (9.1)	4/22 (18.2)	2/22 (9.1)
>16 (n=128)	24 (18.8)	9/24 (37.5)	3/24 (12.5)	6/24 (25.0)	3/24 (12.5)	3/24 (12.5)
<b>Contraceção (n=273)</b>						
Sim (n=243)	44 (16.9)	18/44 (40.9)	6/44 (13.6)	8/44 (18,2)	7/44 (15.9)	5/44 (11.4)
Não (n=13)	2 (15.4)	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	----	----	----
<b>Tipo de Contraceção (n=277)</b>						
Pílula (n=81)	17 (21.0)	8/17 (47.1)	4/17 (23.5)	1/17 (5.9)	2/17 (11.8)	2/17 (11.8)
Preservativo (n=100)	9 (9.0)	3/9 (33.3)	----	3/9 (33.3)	1/9 (11.1)	2/9 (22.2)
Pílula e preservativo (n=79)	18 (22.8)	7/18 (38.9)	2/18 (11.1)	4/18 (22.2)	4/18 (22.2)	1/18 (5.6)
NR (n=17)	2 (11.8)	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	----	----	----

(Continua)

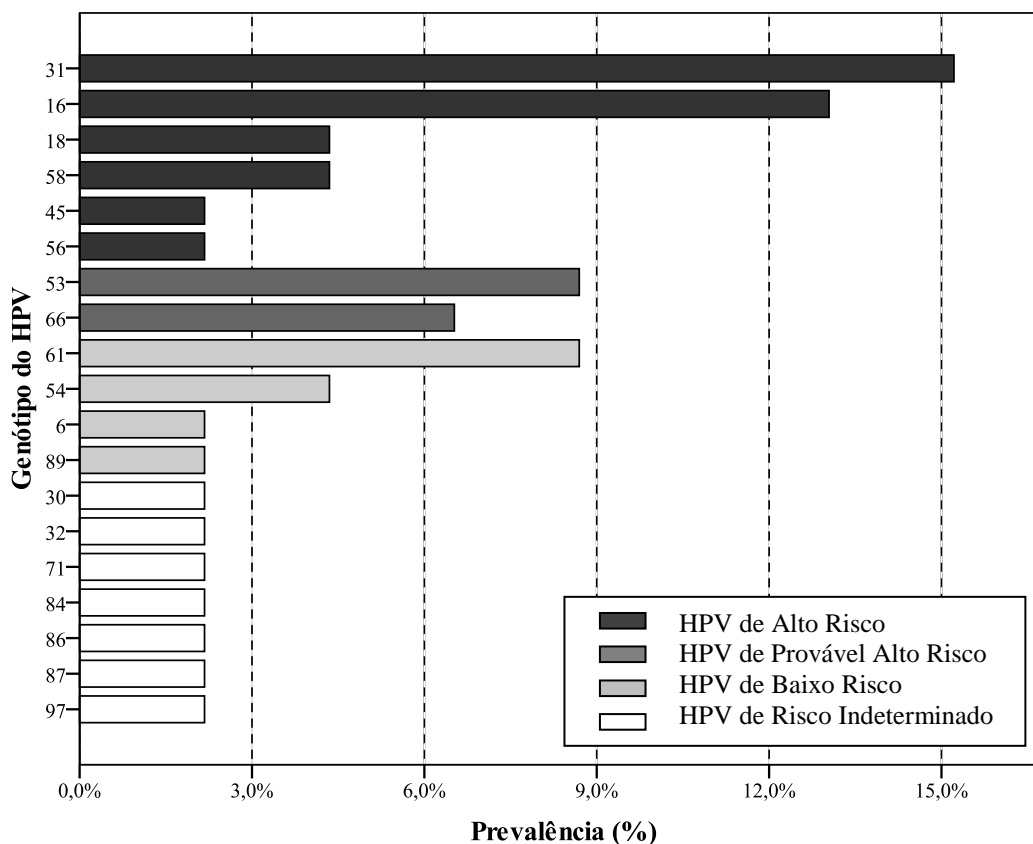
**Tabela 4 (Continuação).** Frequência de HPV nas mulheres sexualmente activas

<b>Hábitos tabágicos (n= 277)</b>						
Fumadora (n=55)	13 (23.6)	5/13 (38.5)	3/13 (23.1)	----	2/13 (15.4)	3 (23.1)
Não-fumadora (n=193)	26 (13.5)	12/26 (46.2)	3/26 (11.5)	6/26 (23.1)	5/26 (19.2)	----
NR (n=27)	7 (25.9)	2/7 (28.6)	1/7 (14.3)	2/7 (28.6)	----	2/7 (28.6)
<b>História de DST (n=277)</b>						
Sim (n=10)	2 (20.0)	1/2 (50.0)	----	1/2 (50.0)	----	----
Não (n=267)	44 (16.5)	18/44 (40.9)	7/44 (15.9)	7/44 (15.9)	7/44 (15.9)	5/44
<b>Nº Parceiros sexuais (n=268)</b>						
1 (n=174)	15 (8.6)	8/15 (53.3)	1/15 (6.7)	2/15 (13.3)	3/15 (20.0)	1/15 (6.7)
2-5 (n=94)	28 (29.8)	10/28 (35.7)	4/28 (14.3)	6/28 (21.4)	4/28 (14.3)	4/28 (14.3)
NR (n=9)	3 (33.3)	1/3 (33.3)	2/3 (66.7)	----	----	----
<b>Nº anos de actividade sexual (n=271)</b>						
≤2 (n=181)	23 (12.7)	11/23 (47.9)	2/23 (8.7)	3/23 (13.0)	3/23 (13.0)	4/23 (17.4)
>2 (n=90)	23 (25.6)	8/23 (34.8)	5/23 (21.7)	5/23 (21.7)	4/23 (17.4)	1/23 (4.3)
<b>Nível de ensino (n=276)</b>						
Pré-universitário (n=180)	23 (12.8)	11/23 (47.9)	4/23 (17.4)	1/23 (4.3)	2/23 (8.7)	5/23 (21.7)
Universitário (n=96)	23 (24.0)	8/23 (34.8)	3/23 (13.0)	7/23 (30.5)	5/23 (21.7)	----
<b>Vacinação contra o HPV (n=251)</b>						
Não (n=154)	34 (22.1)	13/34 (38.2)	7/34 (20.6)	7/34 (20.6)	4/34 (11.8)	3/34 (8.8)
Sim (n=97)	9 (9.3)	5/9 (55.6)	----	----	3/9 (33.3)	1/9 (11.1)
NR (n=22)	3 (13.6)	1/3 (33.3)	----	1/3 (33.3)	----	1/3 (33.3)

HVP AR, HPV de Alto Risco; HPV pAR, HPV de Provável Alto Risco; HPV BR, HPV de Baixo Risco; HPV RI, HPV de Risco Indeterminado; INC, inconclusivo. NR, Não-Responde. As frequências representadas na parte sombreada da tabela representam apenas os casos HPV positivo.

Foram detectados 19 tipos de HPV: 6 de alto risco (HPV16, 18, 31, 45, 56 e 58), 2 de provável alto risco (HPV53 e 66), 4 de baixo risco (HPV6, 54, 61 e 89) e 7 tipos de risco indeterminado (HPV30, 32, 71, 84, 86, 87 e 97).

De acordo com a figura 14, os genótipos de HPV detectados foram: HPV31, o genótipo mais frequente, com 15.2% (7/46), seguido do HPV16 com 13.0% (6/46), HPV53 e 61 com 8.7% (4/46), HPV66 com 6.5% (3/46), HPV 18, 54 e 58 com 4.3% (2/46) e HPV 6, 30, 32, 45, 56, 71, 84, 86, 87, 89 e 97, foram os genótipos menos frequentes, com 2.2% (1/46).



**Figura 13.** Prevalência dos diferentes tipos de HPV para as mulheres sexualmente activas.

Nas participantes pré-universitárias o genótipo mais frequente foi o 31 com 21.7% (5/23), seguido do 16 com 13.0% (3/23). Contrariamente, no grupo das estudantes universitárias os genótipos mais frequentes foram o 16 e 61 com 13.0% (3/23) seguidos do 31, 54 e 66 com

8.7% (2/23). Os genótipos menos frequentes são: 6, 18, 30, 32, 53, 56, 58, 71, 84 e 89 com 4.3% (1/23) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição dos diferentes tipos de HPV de acordo com o nível de ensino

	n= 46	Nível de ensino	
		Pré-universitário (n= 23)	Universitário (n= 23)
HPV AR (n=19)	n (%)	n (%)	n (%)
16	6/46 (13.0)	3/23 (13.0)	3/23 (13.0)
18	2/46 (4.3)	1/23 (4.3)	1/23 (4.3)
31	7/46 (15.2)	5/23 (21.7)	2/23 (8.7)
45	1/46 (2.2)	1/23 (4.3)	----
56	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)
58	2/46 (4.3)	1/23 (4.3)	1/23 (4.3)
HPV pAR (n=7)			
53	4/46 (8.7)	3/23 (13.0)	1/23 (4.3)
66	3/46 (6.5)	1/23 (4.3)	2/23 (8.7)
HPV BR (n=8)			
6	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)
54	2/46 (4.3)	----	2/23 (8.7)
61	4/46 (8.7)	1/23 (4.3)	3/23 (13.0)
89	1/46 (2.2)	-----	1/23 (4.3)
HPV RI (n=7)			
30	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)
32	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)
71	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)
84	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)
86	1/46 (2.2)	1/23 (4.3)	----
87	1/46 (2.2)	1/23 (4.3)	----
97	1/46 (2.2)	----	1/23 (4.3)

HPV AR, HPV de Alto Risco; HPV pAR, HPV de Provável Alto Risco; HPV BR, HPV de Baixo Risco; HPV RI, HPV de Risco Indeterminado.

## 2.1. Cálculo do risco para a infecção por HPV

Obteve-se associação estatística ao comparar a distribuição do HPV com o nível de ensino, vacinação contra o HPV, idade mediana, número de parceiros sexuais e número de anos de actividade sexual (Tabela 6).

Foi encontrada uma forte correlação entre a presença de HPV e mulheres com idade superior a 17 anos (OR = 3.56 IC 95% 1.59-7.97,  $p = 0.001$ ); mulheres com 2-5 parceiros sexuais (OR = 4.50, IC 95% 2.26-8.96,  $p < 0.001$ ); mulheres que iniciaram a vida sexual há mais de dois anos (OR = 2.36, IC 95% 1.24-4.49,  $p = 0.008$ ); mulheres vacinadas contra o HPV (OR = 0.36 IC 95% 0.16 – 0.79,  $p = 0.009$ ) (Tabela 6).

Não se verificou associação estatística entre a presença de HPV e idade mediana da menarca, idade mediana da coitarca, contracepção e hábitos tabágicos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Factores de risco para a infecção por HPV

	<i>p</i>	OR	IC 95%
<b>Nível de ensino</b>			
Pré-universitário vs Universitário	<b>0.018</b>	<b>2.15</b>	<b>1.13 – 4.08</b>
<b>Vacinação contra o HPV</b>			
Vacinada vs Não-vacinada	<b>0.009</b>	<b>0.36</b>	<b>0.16 – 0.79</b>
<b>Idade Mediana</b>			
≤17 vs >17	<b>0.001</b>	<b>3.56</b>	<b>1.59 – 7.97</b>
<b>Idade Mediana de menarca</b>			
≤12 vs >12	0.810	0.93	0.49 – 1.75
<b>Idade Mediana de coitarca</b>			
≤16 vs >16	0.461	1.27	0.67 – 2.40
<b>Nº Parceiros sexuais</b>			
1 vs 2-5	<b>&lt;0.001</b>	<b>4.50</b>	<b>2.26 – 8.96</b>
<b>Nº anos de actividade sexual</b>			
≤2 vs >2	<b>0.008</b>	<b>2.36</b>	<b>1.24 – 4.49</b>
<b>Contracepção</b>			
Não vs Sim	0.885	1.12	0.24 – 5.23
<b>Hábitos tabágicos</b>			
Não Fumadora vs Fumadora	0.068	1.99	0.94 – 4.20

*p*, Nível de significância- Coeficiente de Pearson. OR, *Odds Ratio*; IC, Intervalo de Confiança.

### 3. Distribuição de *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* foi detectada em 6.9% das 435 amostras analisadas. Os casos positivos incluíram seis casos dos quais não havia informação sobre a actividade sexual. Para a análise dos resultados foram consideradas as mulheres que referiram ter iniciado a actividade sexual (n=277) com uma prevalência de *C. trachomatis* de 8.7 % (24/277) (Tabela 7).

A presença de *C. trachomatis* foi correlacionada com a idade mediana, idade mediana da menarca, idade mediana da coitarca, contraceção, hábitos tabágicos, número de parceiros sexuais, número de anos de actividade sexual, nível de ensino e vacinação contra o HPV (Tabela 7).

**Tabela 7.** Caracterização da população e infecção por *C. trachomatis* nas mulheres sexualmente activas

	<i>C. trachomatis</i> Positivo	<i>C. trachomatis</i> Negativo
	n (%)	n (%)
<b>Total (n=277)</b>	24 (8.7)	253 (91.3)
<b>Idade (n=277)</b>		
≤17 (n=107)	3 (2.8)	104 (97.2)
18-20 (n=104)	13 (12.5)	91 (87.5)
>21 (n=66)	8 (12.1)	53 (87.9)
≤17 (n=107)	3 (2.8)	104 (97.2)
>17 (n=170)	21 (12.4)	149 (87.6)
<b>Idade de menarca (n=275)</b>		
≤12 (n=151)	11 (7.3)	144 (92.7)
>12 (n=124)	13 (10.5)	111 (89.5)
<b>Idade de coitarca (n=271)</b>		
≤16 (n=143)	6 (4.2)	137 (95.8)
>16 (n=128)	18 (14.1)	110 (85.9)
<b>Nº Parceiros sexuais (n=268)</b>		
1 (n=174)	14 (8.0)	161 (92.0)
2-5 (n=94)	9 (9.6)	85 (90.4)
NR (n=9)	1 (1.1)	9 (98.9)

(continua)

**Tabela 7 (continuação).** Caracterização da população e infecção por *C. trachomatis* nas mulheres sexualmente activas

<b>Nº anos de actividade sexual (n=271)</b>		
≤2 (n=181)	16 (8.8)	165 (91.2)
>2 (n=90)	8 (8.9)	82 (91.1)
<b>Contraceção (n=273)</b>		
Sim (n=243)	24 (9.2)	219 (90.8)
Não (n=13)	----	----
<b>Tipo de Contraceção (n=260)</b>		
Pílula (n=81)	8 (9.9)	73 (90.1)
Preservativo (n=100)	8 (8.0)	92 (92.0)
Pílula e preservativo (n=79)	8 (10.1)	71 (89.9)
<b>Hábitos tabágicos (n=275)</b>		
Fumadora (n=55)	3 (5.5)	52 (94.5)
Não-fumadora (n=193)	20 (10.4)	173 (89.6)
NR <sup>a</sup> (n=29)	1 (3.4)	28 (96.6)
<b>História de DST (n=277)</b>		
Sim (n=10)	----	----
Não (n=267)	24 (9.0)	243 (91.0)
<b>Nível de ensino (n=276)</b>		
Pré- universitário (n=180)	10 (5.6)	170 (94.4)
Universitário (n=96)	14 (14.6)	82 (85.4)
<b>Vacinação contra o HPV</b>		
Vacinada (n=97)	3 (3.1)	94 (96.9)
Não vacinada (n=154)	18 (11.7)	136 (88.3)

NR, Não Responde.

De acordo com a tabela 7, verificou-se que *C. trachomatis* foi mais frequente nas estudantes universitárias (14.6%), nas mulheres com idade superior a 17 anos (12.4%) e que iniciaram a actividade sexual depois dos 16 anos (14.1%).

Os resultados obtidos revelaram que todos os casos positivos por *C. trachomatis* não estavam associadas à história de DST (Tabela 7).

### 3.1. Cálculo do risco para a infecção por *Chlamydia trachomatis*

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ao comparar a distribuição de *C. trachomatis* com a idade mediana, idade mediana da coitarca, nível educacional e vacinação contra o HPV. Foi encontrada uma forte correlação entre a presença de *C. trachomatis* e mulheres com idade superior a 17 anos (OR = 4.87 IC 95% 1.42 – 16.81,  $p = 0.006$ ); mulheres que iniciaram a actividade sexual depois dos 16 anos (OR = 3.74 IC 95% 1.43 – 9.73,  $p = 0.004$ ); estudantes universitárias (OR = 2.90 95% IC 1.24 – 6.81,  $p = 0.011$ ); vacinação contra o HPV (OR = 0.24 95% IC 0.07 – 0.84,  $p = 0.017$ ) (Tabela 8).

Não se verificou associação estatística entre a presença de *C. trachomatis* e idade mediana da menarca, número de parceiros sexuais, número de anos de actividade sexual, contraceção e hábitos tabágicos, (Tabela 8).

**Tabela 8.** Factores de risco para a infecção por *C. trachomatis*

	<i>p</i>	OR	IC 95%
<b>Nível de ensino</b>			
Pré-universitário vs Universitário	<b>0.011</b>	<b>2.90</b>	<b>1.24 – 6.813</b>
<b>Vacinação contra o HPV</b>			
Vacinada vs Não-vacinada	<b>0.017</b>	<b>0.24</b>	<b>0.07 – 0.84</b>
<b>Idade Mediana</b>			
≤17 vs >17	<b>0.006</b>	<b>4.87</b>	<b>1.42 – 16.81</b>
<b>Idade Mediana de menarca</b>			
≤12 vs >12	0.350	1.49	0.64 – 3.46
<b>Idade Mediana de coitarca</b>			
≤16 vs >16	<b>0.004</b>	<b>3.74</b>	<b>1.43 – 9.73</b>
<b>Nº Parceiros sexuais</b>			
1 vs 2-5	0.670	1.21	0.50 – 2.91
<b>Nº anos de actividade sexual</b>			
≤2 vs >2	0.989	1.01	0.41 – 2.45
<b>Contraceção</b>			
Não vs Sim	0.251	1.10	1.06 – 1.15
<b>Hábitos tabágicos</b>			
Fumadora vs Não-fumadora	0.268	0.50	0.14 – 1.75

*p*, Nível de significância- Coeficiente de Pearson. OR, *Odds Ratio*; IC, Intervalo de Confiança.

#### **4. Detecção de *Chlamydia trachomatis* na presença ou ausência do HPV**

*C. trachomatis* foi detectada em 13.0% (6/46) dos casos HPV positivo e em 7.8% (18/231) dos casos HPV negativo. Não se verificou associação estatisticamente significativa entre o número de co-infecções por HPV e *C. trachomatis* ( $OR = 1.78$  95% IC 0.67 – 4.75,  $p = 0.248$ ).

De entre os casos positivos 6 casos positivos para *C. trachomatis* e HPV, verificou-se que 3 casos foram positivos para HPV de alto risco, um para HPV de provável alto risco e 2 para HPV de baixo risco.

## V. DISCUSSÃO

As DSTs constituem hoje um dos principais problemas de saúde dos indivíduos sexualmente activos. Adolescentes e jovens adultos (15-24 anos) representam 25% da população sexualmente activa (Weinstock *et al.*, 2004).

Neste estudo pretendeu-se determinar a prevalência de HPV, por este ser o agente sexualmente transmissível mais comum em populações jovens; avaliar a prevalência de *C. trachomatis*; avaliar possíveis factores de risco para a infecção pelos agentes em estudo e determinar a presença de infecções concomitantes por HPV e *C. trachomatis*, uma vez que existem estudos que referenciam esta bactéria como co-factor do HPV na etiologia da neoplasia do colo uterino.

A primeira fase do estudo centrou-se na detecção do HPV pela técnica da PCR e caracterização da frequência dos vários génotipos do HPV por RFLP. Estudos anteriormente publicados referem que a prevalência global da infecção por HPV na população estuda pode variar de 2% a 44%, com maior prevalência em mulheres com idade compreendida entre 20 e 24 anos (Dunne *et al.*, 2007; Trottier e Franco, 2006). Os resultados mostraram uma prevalência global de HPV de 11.5% (50/435). Considerando a actividade sexual como um importante factor para a aquisição do HPV, a prevalência entre mulheres jovens sexualmente activas foi de 16.6% (46/277). A frequência obtida é concordante com outros estudos, que referem que a infecção por HPV em mulheres assintomáticas varia de 12 a 31.4% dependendo da população (Ammatuna *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 1995; Winer *et al.*, 2003; Woodman *et al.*, 2001).

Apesar de existirem outros estudos realizados por investigadores portugueses, na área da epidemiologia do HPV (Medeiros *et al.*, 2005; Nobre *et al.*, 2010), este é o primeiro estudo que realizado para caracterizar o perfil de HPV e *C. trachomatis* em mulheres jovens assintomáticas, através do método de auto-colheita. O kit UCM utilizado para colheita das células do colo do útero foi referenciado em vários estudos, como um método apropriado para a preservação celular, e detecção molecular de HPV, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoea* (Ferreccio *et al.*, 2008; Taha *et al.*, 2006; Brink *et al.*, 2007). O método de auto-colheita permitiu obter uma boa quantidade de DNA e demonstrou uma grande utilidade para a detecção de HPV e Clamídia, resultado concordante com outros estudos de detecção destes

agentes através de auto-colheita (Hobbs *et al.*, 2008; Wiesenfeld *et al.*, 2001; Petignat *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos indicam que a idade é um factor importante para a infecção por HPV. A presença de HPV foi mais frequente em mulheres com idade superior a 17 anos (OR = 3.56 IC 95% 1.59-7.97,  $p = 0.001$ ), sendo estes dados concordantes com referências internacionais, que indicam que a infecção por HPV é mais comum em mulheres jovens sexualmente activas, com idade inferior a 34 anos (De Sanjose *et al.*, 2007; Moscicki, 2005; Sellors *et al.*, 2000).

Quando analisados os resultados referentes à idade mediana de menarca, verificou-se que não havia associação estatística entre esta variável e a infecção por HPV (OR = 0.93, 95% IC 0.49-1.75,  $p = 0.810$ ). A mediana de idade de menarca foi de  $12 \pm 1.34$  anos, correspondente à idade média de menarca encontrada num estudo transversal antropométrico realizado em 2003, por Padez e Rocha, em 516 estudantes portuguesas. A idade média de menarca foi de  $12.03 \pm 1.26$  anos (Padez e Rocha, 2003).

Ao longo de toda a investigação sobre o HPV, vários estudos têm confirmado a relação entre a actividade sexual e a infecção por HPV. A mulher adquire mais facilmente uma DST do que o homem, devido à condição anatómica e fisiológica do tracto genital. Desta forma, a idade da primeira relação sexual pode ser relacionada com a infecção por HPV e *C. trachomatis* em adolescentes e mulheres jovens. Estas observações baseiam-se em diferenças biológicas no epitélio cervical. O epitélio cervical nas jovens é do tipo colunar e metaplásico, contrariamente ao epitélio cervical de uma mulher adulta que é predominantemente espinocelular (Braverman, 2000; Moscicki *et al.*, 1999).

A idade de coitarca constitui um dos factores de risco para a infecção por HPV, pois quanto mais cedo é iniciada a actividade sexual maior é a probabilidade de ficar infectada (Janicek e Averette, 2001; Trottier e Burchell, 2009). No entanto, na nossa amostra populacional, a idade de coitarca não parece ser um co-factor para a infecção por HPV (OR = 1.27 95% IC 0.67 – 2.40,  $p = 0.461$ ), uma vez que, a frequência de estudantes que iniciaram a actividade sexual com idade inferior e superior a 16 anos foi idêntica, 15.4% e 18.8%, respectivamente. Estes resultados surgem em concordância com um estudo realizado no Brasil, em jovens que frequentavam o ensino básico e secundário público, em que a idade de coitarca não foi associada com a prevalência de HPV (Oliveira *et al.*, 2010). Um outro estudo realizado em

2000 por Sellors e colaboradores, mostra ausência de associação entre a idade de início de actividade sexual e positividade para HPV (Sellors *et al.*, 2000).

O número de parceiros sexuais tem sido descrito como um dos principais co-factores associado à infecção por este vírus (Franco *et al.*, 2001; Janicek e Averette, 2001; Moscicki, 2005). No nosso estudo observou-se que o aumento do número de parceiros sexuais está associado com uma maior probabilidade de infecção por HPV, pois mulheres que tinham apenas um parceiro sexual apresentavam menor taxa de infecção do que aquelas com 2-5 parceiros (OR = 4.50, IC 95% 2.26-8.96,  $p < 0.001$ ). Por outro lado, observou-se um aumento da probabilidade de infecção em mulheres que iniciaram a actividade sexual há mais de dois anos (OR = 2.36, 95% IC 1.24-4.49,  $p = 0.008$ ), permitindo supor que quanto maior o tempo de actividade sexual, maior será a probabilidade de infecção por HPV.

Dado que a idade mediana de coitarca foi de 16 anos, é esperado que as estudantes universitárias, com mais de 17 anos e com 2-5 parceiros sexuais, apresentem maior frequência de HPV. Com base nos resultados obtidos, as estudantes universitárias estão expostas com maior frequência à infecção por HPV, comparativamente às estudantes pré-universitárias (OR = 2.15 95% IC 1.13-4.08,  $p = 0.018$ ).

O Programa Nacional de Vacinação de Portugal incluiu há 3 anos, a vacina contra o HPV para mulheres jovens entre 13 e 18 anos. Os nossos dados indicam que a vacinação pode reduzir de forma eficiente a infecção por HPV. As estudantes vacinadas apresentaram menor taxa de infecção quando comparadas com as estudantes não vacinadas (OR = 0.36, 95% IC 0.16-0.79,  $p = 0.009$ ), uma vez que, 73.2% das estudantes com idade igual ou inferior a 17 anos são vacinadas. Estes dados reforçam a importância da vacinação na prevenção eficaz contra a infecção por HPV (Castellsague *et al.*, 2008; De Sanjose *et al.*, 2008).

Apesar destes dados epidemiológicos serem importantes, não são suficientes por si só, sendo a caracterização da frequência dos genótipos de HPV cada vez mais considerada necessária para estudar a infecção (De Sanjose *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2005; Nobre *et al.*, 2010). Os testes de diagnóstico, como a Captura Híbrida de segunda geração, *hc2* e PCR utilizando os *primers*, MY09/11 e GP5 +/6 +, permitem a detecção de um grande número de tipos de HPV, principalmente os tipos de alto risco. Estes conjuntos de *primers* têm sido largamente utilizados para estudar a história natural do HPV e o seu papel no desenvolvimento da neoplasia do colo uterino (Iftner e Villa, 2003; Villa e Denny, 2006).

No nosso estudo, utilizamos o método de genotipagem descrito por Nobre e colaboradores em 2008, que permite uma boa discriminação dos tipos de HPV mucosotrópicos, incluindo vários tipos de HPV que não são detectados pelos métodos actuais de diagnóstico. Foram detectados 13 tipos de HPV que não são detectados pela maioria dos testes comerciais actuais (HPV 34, 53, 61, 62, 66, 67, 70, 71, 73, 81, 83, 84 e 102).

Os tipos de HPV oncogénicos foram predominantes na população em estudo (41.3%) (Castle *et al.*, 2006; De Sanjose *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010). Dentro deste grupo, o HPV31 é o mais prevalente, seguido do HPV16, 18, 58, 45 e 56. O HPV31 foi o genótipo mais frequente (15.2%) no estudo, o que pode dever-se ao tipo de população e à faixa etária considerada, uma vez que as participantes são estudantes, com idades compreendidas entre os 14 e 30 anos. Os nossos resultados revelam ainda que no grupo das estudantes pré-universitárias o genótipo de alto risco mais frequente foi o HPV 31 (21.7%), contrariamente ao grupo das estudantes universitárias, em que o tipo de HPV com maior frequência foi o HPV16 (13%). Um estudo realizado por M. Clara Bicho e apresentado no EUROGIN 2011 (*European Research Organisation on Genital Infection and Neoplasia*), demonstrou que em mulheres com citologia normal, o HPV31 foi o mais prevalente seguido do HPV 16.

Uma meta-análise publicada em 2007 por Sanjose e colaboradores mostra que os três tipos de HPV mais frequentes em mulheres europeias com citologia normal são: HPV 16, 18 e 31 (De Sanjose *et al.*, 2007). O HPV18 é o segundo tipo de HPV oncogénico associado ao desenvolvimento de CCU (De Sanjose *et al.*, 2007). Os nossos resultados mostraram que o HPV18 se encontra entre os tipos de HPV de alto risco menos frequentes (4.3%). Sabe-se que a infecção por HPV18 leva a um rápido início de neoplasia do colo do útero (Oliveira *et al.*, 2010), e espera-se ser mais frequentemente encontrado em lesões de alto grau, do que em mulheres jovens assintomáticas (Woodman *et al.*, 2003).

Dentro do grupo de HPV de provável alto risco, o genótipo mais frequente foi o HPV53 (8.7%), seguido do HPV66 (6.5%). Relativamente ao grupo de HPV de baixo risco, os nossos resultados mostraram que o tipo de HPV mais frequente foi o HPV61 (8.7%), seguido do HPV54, 6 e 89. Estes dados seguem a tendência documentada na literatura (Nobre *et al.*, 2010). O estudo de Nobre e colaboradores, baseado numa amostra por conveniência (mulheres seguidas no Instituto Português de Oncologia de Coimbra), recolhida durante o ano 2005 e 2006, permitiu verificar percentagens de infecção de HPV53 e 61 de 5.6% e 2.1%,

respectivamente (Nobre *et al.*, 2010). O HPV apresenta uma distribuição e frequência geográfica variável e alguns dos tipos HPV ainda não têm definido o seu potencial patogénico. Os nossos resultados indicam que 15.2% dos HPVs detectados são HPV de risco indeterminado. Estes dados são concordantes com os dados referidos em alguns estudos previamente realizados (Menzo *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010).

Contudo, não foi possível determinar o genótipo de HPV em 10.9% (n=5) dos casos positivos. Uma possível explicação reside no facto de poderem existir co-infecções por vários tipos de HPV, que torna difícil a interpretação dos resultados do RFLP, uma vez que as amostras apresentam comportamentos diferentes, não sendo possível seguir o algoritmo proposto por Nobre e colaboradores, 2008 (Nobre *et al.*, 2008).

A segunda fase do trabalho baseou-se na detecção de *C. trachomatis* pela técnica da PCR. A infecção por *C. trachomatis* é reconhecida como a segunda causa de DSTs em todo o mundo, principalmente em populações jovens.

Os resultados obtidos mostram uma prevalência global de *C. trachomatis* de 6.9% (30/435); considerando as estudantes que referiram ter iniciado a actividade sexual, a prevalência de foi de 8.7% (24/277). Dados europeus referem que a prevalência da infecção por *C. trachomatis* em mulheres assintomáticas pode variar entre 1.7% a 17%, dependendo do tipo de população e país (Wilson *et al.*, 2002). Os nossos resultados são consistentes com um estudo realizado por Wiesenfeld e colaboradores, com 228 estudantes com idade entre os 15 e 19 anos, em que a prevalência obtida foi 8.9% (Wiesenfeld *et al.*, 2001).

Têm sido descritos na literatura vários factores de risco associados à infecção por *C. trachomatis* como: idade, número de parceiros sexuais, uso de contraceptivos, idade de coitarca, entre outros. Os nossos resultados mostram que a idade é um factor importante na aquisição desta infecção. *C. trachomatis* foi mais frequentemente isolada em mulheres com idade superior a 17 anos (OR = 4.87 IC 95% 1.42-16.81,  $p = 0.006$ ), sendo estes dados concordantes com estudos internacionais, que referem que a infecção por esta bactéria é mais comum em mulheres jovens, sexualmente activas, com idade inferior a 24 anos (Manavi, 2006; Tabora *et al.*, 2005). As estudantes universitárias apresentam uma maior probabilidade de infecção por *C. trachomatis* comparativamente às estudantes pré-universitárias (OR = 2.90 IC 95% 1.24-6.81,  $p = 0.011$ ), dado que surge de acordo com o resultado obtido para a idade.

Quando analisados os resultados referentes à idade mediana de menarca, verificou-se que não havia associação estatística entre esta variável e infecção por *C. trachomatis* (OR = 1.49, 95% IC 0.64-3.46,  $p = 0.350$ ), dados que vão de encontro aos resultados para a idade mediana de menarca apresentada no estudo de Padez e Rocha (Padez e Rocha, 2003).

Os resultados obtidos revelam que as estudantes que iniciaram a actividade sexual depois dos 16 anos (OR = 4.87 IC 95% 1.42-16.81,  $p = 0.006$ ) têm maior probabilidade de adquirir *C. trachomatis* pois apresentam uma maior frequência (Navarro *et al.*, 2002). Como o referido anteriormente a idade de início da actividade sexual pode ser correlacionada com a infecção por *C. trachomatis*, devido ao tipo de epitélio cervical (Braverman, 2000; Navarro *et al.*, 2002).

Em relação à vacinação contra o HPV, observou-se que as jovens vacinadas apresentavam menor probabilidade de infecção por *C. trachomatis* (OR = 0.24 IC 95% 0.07-0.842,  $p = 0.017$ ). Na literatura consultada, não encontrei qualquer associação entre a vacinação contra o HPV e protecção contra a infecção por *C. trachomatis*. Este resultado pode dever-se ao facto da idade ter constituído um factor de risco para a infecção por HPV e *C. trachomatis*. As jovens com idade superior a 17 anos apresentaram maior probabilidade de infecção por HPV e *C. trachomatis*, uma vez que apenas 18.2% das jovens incluídas nesta faixa etária são vacinadas.

Os comportamentos sexuais de risco, designadamente, o número de parceiros sexuais, tem sido referenciado como factor predisponente para a infecção por *C. trachomatis*. No nosso estudo, contrariamente aos resultados obtidos para o HPV, o número de parceiros sexuais não constituiu um factor de risco (OR = 1.21 IC 95% 0.50-2.91,  $p = 0.670$ ), uma vez que, a frequência de *C. trachomatis* foi semelhante nas estudantes que tinham 1 ou 2 a 5 parceiros sexuais. Da mesma forma, não se observaram diferenças estaticamente significativas nas participantes que iniciaram a actividade sexual há mais de dois anos (OR = 1.01 IC 95% 0.41-2.45,  $p = 0.989$ ) (Navarro *et al.*, 2002; Porras *et al.*, 2008).

O resultado relativo à contracepção não foi estatisticamente significativo para a infecção por HPV (OR = 1.12, 95% IC 0.24-5.23,  $p = 0.461$ ) e *C. trachomatis* (OR = 1.10, 95% IC 1.06-1.15,  $p = 0,251$ ). É importante referir que a frequência de HPV foi superior nas jovens que referiram usar métodos anticoncepcionais, verificando-se uma maior frequência nas estudantes que utilizavam só a pílula, e pílula e preservativo contrariamente ao preservativo.

Relativamente *C. trachomatis*, a totalidade dos casos positivos foi registada nas estudantes que referiram usar métodos anticoncepcionais, sendo a frequência idêntica nas que utilizavam os três grupos de contraceptivos. Estes resultados vão de encontro à necessidade de educar para a saúde. A correcta informação sobre as DSTs, aliada à forma de protecção, pode ser um importante passo no desenvolvimento de competências para tomar decisões responsáveis.

Foi também objectivo deste trabalho determinar a ocorrência de co-infecções por HPV e *C. trachomatis*. Os resultados mostraram ausência de associação estatística entre a infecção concomitante por HPV e *C. trachomatis* (OR =1.78 95% IC 0.67-4.75,  $p = 0.248$ ). Estes dados seguem a tendência documentada na literatura (Castle *et al.*, 2003; Castellsague *et al.*, 2006; Reesink-Peters *et al.*, 2001; Zereu *et al.*, 2007). Estes autores referem que a inflamação cervical relacionada com a infecção por HPV não está associada à presença de *C. trachomatis*.

A literatura é esclarecedora no que respeita a influência do tabaco como co-factor de CCU. Sabe-se que o tabaco é capaz de induzir o seu efeito cancerígeno em órgãos que não estão directamente expostos ao fumo do tabaco, tais como o rim, bexiga e colo do útero (Franco *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2005). Os resultados obtidos não revelam associação estatística entre os hábitos tabágicos e presença de HPV (OR =1.99 95% IC 0.94-4.20,  $p = 0.068$ ), e *C. trachomatis* (OR =0.50 95% IC 0.14-1.75,  $p = 0.268$ ), uma vez que a maior parte das infecções se verifica nas estudantes não-fumadoras.

A análise estatística permite verificar que 97.2% das estudantes incluídas neste estudo referenciou não ter história de DST. A infecção por HPV e *C. trachomatis* é considerada por muitos autores como uma epidemia silenciosa (Darville, 2006; Oliveira *et al.*, 2010; Trotter e Burchell, 2009).

A monitorização da incidência e prevalência das DSTs na população, particularmente em jovens, é importante para avaliar medidas de controlo e prevenção destas doenças. Segundo a OMS, o combate à propagação das DSTs deve constituir uma prioridade, uma vez que estas doenças representam uma fonte significativa de morbidade e mortalidade. No entanto, a natureza assintomática das DSTs, constitui um obstáculo ao diagnóstico, tratamento e vigilância (Weinstock *et al.*, 2004).

Como forma de prevenção são muito importantes campanhas dirigidas à população em geral e aos jovens em particular. É necessário educar para a saúde transmitindo os cuidados inerentes a cada indivíduo, como o uso do preservativo, fidelidade ao parceiro sexual, higiene pessoal, a manutenção de hábitos de vida saudáveis e acompanhamento médico regular. É de igual forma importante consciencializar as populações mais jovens das consequências que podem ter as DSTs, nomeadamente, CCU, sequelas reprodutivas, partos prematuros e mortalidade neonatal.

Nos últimos anos temos assistido ao advento das metodologias de biologia molecular para detecção de ácidos nucleicos, que devido à sua alta sensibilidade e especificidade, representam uma alternativa viável para o diagnóstico de pessoas infectadas, mesmo as assintomáticas.

A auto-colheita cervical pode ser uma alternativa ao exame espelho-vaginal médico como instrumento de rastreio de infecção por HPV e *C. trachomatis*, em mulheres jovens assintomáticas. Este estudo contribuiu para uma melhor compreensão da epidemiologia da infecção por HPV e *C. trachomatis* nas mulheres jovens portuguesas. O conhecimento do perfil de HPV em mulheres jovens pode ser importante para avaliar as estratégias de vacinação em diferentes populações.

A vacinação contra o HPV é uma das descobertas mais marcantes da última década e, a sua implementação está prevista para prevenir, no futuro, uma proporção substancial de CCU bem como outro tipo de patologias relacionadas com a infecção por HPV. Para além da prevenção primária, a imunização com vacina contra o HPV, o rastreio deve ser mantido como forma de prevenção secundária, dado que as jovens ou mulheres podem ter sido infectadas antes da vacinação e a vacinação não oferece protecção contra todos os tipos de CCU.

O aumento da taxa de infecções genitais por *C. trachomatis*, a natureza das infecções assintomáticas e a possibilidade de resistência a antibióticos em desenvolvimento, conduzem a uma necessidade urgente para o desenvolvimento de uma vacina que proteja contra a infecção e desenvolvimento de patologias associadas. A pesquisa de vacinas contra Clamídia ocorre há mais de 20 anos, contudo, até à data, nenhuma vacina profilática está implementada (Carey e Beagley, 2010).

Apesar de todos os avanços médico-científicos, o estigma da sociedade perante as DTSSs continua a ter uma conotação nas relações sociais, uma vez relacionadas com a actividade sexual. O recurso ao diagnóstico e protecção das relações entre pares são obstáculos e ao mesmo tempo constituem as principais formas de prevenir a chamada epidemia das DSTs.

## VI. CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se associação estatisticamente significativa entre o HPV e nível de ensino, vacinação contra o HPV, idade mediana, número de parceiros sexuais e número de anos de actividade sexual ( $p < 0.05$ ).

A associação entre *C. trachomatis* e o nível educacional, vacinação contra o HPV, idade mediana e idade de coitarca foi estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Relativamente à ocorrência de co-infecções por HPV e Clamídia conclui-se que, não havia relação estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

O método auto-colheita mostrou ser uma ferramenta útil para a detecção de HPV e Clamídia em mulheres jovens assintomáticas. Desta forma, o rastreio é essencial para entender não só a epidemiologia das DSTs, mas também os comportamentos e as práticas da comunidade. Os jovens devem ser educados sobre as DSTs e factores de risco associados às mesmas, devem também ser encorajados a obter cuidados ginecológicos adequados, após o início da actividade sexual.

Em conclusão, o conhecimento do perfil de HPV e *C. trachomatis* em mulheres jovens pode ser importante para avaliar e direccionar as estratégias de vacinação e rastreio em diferentes populações.

## VII. BIBLIOGRAFIA

Ammatuna, P., Giovannelli, L., Matranga, D., Ciriminna, S. & Perino, A. 2008. Prevalence of genital human papilloma virus infection and genotypes among young women in Sicily, South Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 2002-6.

Anttila, T., Saikku, P., Koskela, P., Bloigu, A., Dillner, J., Ikaheimo, I., Jellum, E., Lehtinen, M., Lenner, P., Hakulinen, T., Narvanen, A., Pukkala, E., Thoresen, S., Youngman, L. & Paavonen, J. 2001. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*, 285, 47-51.

ARS- CENTRO 1990. Plano de Nacional Oncológico- Programa de Rastreio do Cancro do Colo do Útero na Região Centro.

Bebear, C. & De Barbeyrac, B. 2009. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect*, 15, 4-10.

Braverman, P. K. 2000. Sexually transmitted diseases in adolescents. *Med Clin North Am*, 84, 869-89, vi-vii.

Brink, A. A., Snijders, P. J. & Meijer, C. J. 2007. HPV detection methods. *Dis Markers*, 23, 273-81.

Burchell, A. N., Winer, R. L., De Sanjose, S. & Franco, E. L. 2006. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/52-61.

Byrne, G. I. & Ojcius, D. M. 2004. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 2, 802-8.

Carey, A. J. & Beagley, K. W. 2010. Chlamydia trachomatis, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol*, 63, 576-86.

Castellsague, X., Diaz, M., De Sanjose, S., Munoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., Peeling, R. W., Ashley, R., Smith, J. S., Snijders, P. J., Meijer, C. J. & Bosch, F. X. 2006. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*, 98, 303-15.

Castellsague, X., Klaustermeier, J., Carrilho, C., Albero, G., Sacarlal, J., Quint, W., Kleter, B., Lloveras, B., Ismail, M. R., De Sanjose, S., Bosch, F. X., Alonso, P. & Menendez, C. 2008. Vaccine-related HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: burden and potential for prevention. *Int J Cancer*, 122, 1901-4.

Castellsague, X. & Munoz, N. 2003. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 20-8.

Castle, P. E., Escoffery, C., Schachter, J., Rattray, C., Schiffman, M., Moncada, J., Sugai, K., Brown, C., Cranston, B., Hanchard, B., Palefsky, J. M., Burk, R. D., Hutchinson, M. L. & Strickler, H. D. 2003. Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotropic virus type 1 are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. *Sex Transm Dis*, 30, 575-80.

Castle, P. E. & Giuliano, A. R. 2003. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 29-34.

Castle, P. E., Jeronimo, J., Schiffman, M., Herrero, R., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., Hildesheim, A., Wacholder, S., Long, L. R., Neve, L., Pfeiffer, R. & Burk, R. D. 2006. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res*, 66, 1218-24.

CDC 2010. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2009, . Atlanta: U.S.: Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services.

Cevenini, R., Donati, M. & Sambri, V. 2002. Chlamydia trachomatis - the agent. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 16, 761-73.

Chen, X. S., Yin, Y. P., Liang, G. J., Gong, X. D., Li, H. S., Pomerol, G., Thuy, N., Shi, M. Q. & Yu, Y. H. 2005. Sexually transmitted infections among female sex workers in Yunnan, China. *AIDS Patient Care STDS*, 19, 853-60.

Darville, T. 2006. Chlamydia trachomatis genital infection in adolescents and young adults. *Adv Exp Med Biol*, 582, 85-100.

De Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., Van Den Brule, A. J., Meijer, C. J. & Snijders, P. J. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, 76, 1057-1062.

De Sanjose, S., Alemany, L., Castellsague, X. & Bosch, F. X. 2008. Human papillomavirus vaccines and vaccine implementation. *Womens Health (Lond Engl)*, 4, 595-604.

De Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N. & Bosch, F. X. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7, 453-9.

De Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L. E., Shin, H. R., Vallejos, C. S., De Ruiz, P. A., Lima, M. A., Guimera, N., Clavero, O., Alejo, M., Llombart-Bosch, A., Cheng-Yang, C., Tatti, S. A., Kasamatsu, E., Iljazovic, E., Odida, M., Prado, R., Seoud, M., Grce, M., Usubutun, A., Jain, A., Suarez, G. A., Lombardi, L. E., Banjo, A., Menendez, C., Domingo, E. J., Velasco, J., Nessa, A., Chichareon, S. C., Qiao, Y. L., Lerma, E., Garland, S. M., Sasagawa, T., Ferrera, A., Hammouda, D., Mariani, L., Pelayo, A., Steiner, I., Oliva, E., Meijer, C. J., Al-Jassar, W. F., Cruz, E., Wright, T. C., Puras, A., Llave, C. L., Tzardi, M., Agorastos, T., Garcia-Barriola, V., Clavel, C., Ordi, J., Andujar, M., Castellsague, X., Sanchez, G. I., Nowakowski, A. M., Bornstein, J., Munoz, N. & Bosch, F. X. 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 11, 1048-56.

De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & Zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.

DGS 2008. *Despacho n.º 8378/2008, de 20 de Março* [Online]. [http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/88239184-3C05-4EE2-8D8D-437CFC40DCE8/0/Desp8378\\_NovoesquemadoPNV.pdf](http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/88239184-3C05-4EE2-8D8D-437CFC40DCE8/0/Desp8378_NovoesquemadoPNV.pdf). [Visualizado em Março de 2011].

Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S7-15.

Dunne, E. F., Unger, E. R., Sternberg, M., Mcquillan, G., Swan, D. C., Patel, S. S. & Markowitz, L. E. 2007. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, 297, 813-9.

ECDC 2010. *Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe*, Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control.

Fehrmann, F. & Laimins, L. A. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22, 5201-7.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.

Ferreccio, C., Corvalan, A., Margozzini, P., Viviani, P., Gonzalez, C., Aguilera, X. & Gravitt, P. E. 2008. Baseline assessment of prevalence and geographical distribution of HPV types in Chile using self-collected vaginal samples. *BMC Public Health*, 8, 78.

Figuroa, J. P., Ward, E., Luthi, T. E., Vermund, S. H., Brathwaite, A. R. & Burk, R. D. 1995. Prevalence of human papillomavirus among STD clinic attenders in Jamaica: association of younger age and increased sexual activity. *Sex Transm Dis*, 22, 114-8.

Franco, E. L. & Cuzick, J. 2008. Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination. *Vaccine*, 26 Suppl 1, A16-23.

Franco, E. L., Duarte-Franco, E. & Ferenczy, A. 2001. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, 164, 1017-25.

Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 75, 1565-70.

GLOBOCAN 2008. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008* [Online]. <http://globocan.iarc.fr/>. [Visualizado em Janeiro de 2011].

Gravitt, P. E., Peyton, C. L., Alessi, T. Q., Wheeler, C. M., Coutlee, F., Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Scott, D. R. & Apple, R. J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 38, 357-61.

Hildesheim, A., Hadjimichael, O., Schwartz, P. E., Wheeler, C. M., Barnes, W., Lowell, D. M., Willett, J. & Schiffman, M. 1999. Risk factors for rapid-onset cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 180, 571-7.

Hobbs, M. M., Van Der Pol, B., Totten, P., Gaydos, C. A., Wald, A., Warren, T., Winer, R. L., Cook, R. L., Deal, C. D., Rogers, M. E., Schachter, J., Holmes, K. K. & Martin, D. H. 2008. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sex Transm Dis*, 35, 8-13.

Iftner, T. & Villa, L. L. 2003. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 80-8.

INFARMED, 2007. Resumo das Características do Medicamento - Cervarix®.

INFARMED, 2006. Resumo das Características do Medicamento - Gardasil®.

Janicek, M. F. & Averette, H. E. 2001. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin*, 51, 92-114; quiz 115-8.

Jensen, J. S., Bjornelius, E., Dohn, B. & Lidbrink, P. 2004. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis*, 31, 499-507.

Joura, E. A., Leodolter, S., Herneez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Koutsky, L. A., Garle, S. M., Harper, D. M., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Jones, R. W., Bryan, J., Taddeo, F. J., Bautista, O. M., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J. W., Sattler, C., Barr, E. & Paavonen, J. 2007. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet*, 369, 1693-702.

Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Ses, J. A., Jansen, K. U. & Keller, P. M. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*, 274, 5810-22.

Kahn, J. A. 2004. Self-testing for human papillomavirus using a vaginal swab: placing prevention of cervical cancer in the patient's hands. *Ann Oncol*, 15, 847-9.

Kleter, B., Van Doorn, L. J., Schrauwen, L., Molijn, A., Sastrowijoto, S., Ter Schegget, J., Lindeman, J., Ter Harmsel, B., Burger, M. & Quint, W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*, 37, 2508-17.

Kulasingam, S. L., Hughes, J. P., Kiviat, N. B., Mao, C., Weiss, N. S., Kuypers, J. M. & Koutsky, L. A. 2002. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*, 288, 1749-57.

Labpec, L. 2007. <http://www.labpec.com.br/SistemaDna2.asp>. [Visualizado em Janeiro de 2011].

Leggatt, G. R. & Frazer, I. H. 2007. HPV vaccines: the beginning of the end for cervical cancer. *Curr Opin Immunol*, 19, 232-8.

Leung, A. K., Kellner, J. D. & Davies, H. D. 2005. Genital infection with human papillomavirus in adolescents. *Adv Ther*, 22, 187-97.

Manavi, K. 2006. A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 20, 941-51.

Manos, M. M., Ting, Y., Wright, D. K., Lewis, A. J., Broker, T. R. & Wolinsky, S. M. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 7, 209-214.

Matos, A., Moutinho, J., Pinto, D. & Medeiros, R. 2005. The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population. *Eur J Cancer Prev*, 14, 485-91.

Medeiros, R., Prazeres, H., Pinto, D., Macedo-Pinto, I., Lacerda, M., Lopes, C. & Cruz, E. 2005. Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a southern European population at high risk of cervical cancer. *Eur J Cancer Prev*, 14, 467-71.

Menzo, S., Ciavattini, A., Bagnarelli, P., Marinelli, K., Sisti, S. & Clementi, M. 2008. Molecular epidemiology and pathogenic potential of underdiagnosed human papillomavirus types. *BMC Microbiol*, 8, 112.

Molijn, A., Kleter, B., Quint, W. & Van Doorn, L. J. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S43-51.

Moreno, V., Bosch, F. X., Munoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V., Walboomers, J. M., Herrero, R. & Franceschi, S. 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359, 1085-92.

Moscicki, A. B. 2003. Cervical cytology screening in teens. *Curr Womens Health Rep*, 3, 433-7.

Moscicki, A. B. 2005. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health*, 37, S3-9.

Moscicki, A. B., Burt, V. G., Kanowitz, S., Darragh, T. & Shiboski, S. 1999. The significance of squamous metaplasia in the development of low grade squamous intraepithelial lesions in young women. *Cancer*, 85, 1139-44.

Moscicki, A. B., Hills, N., Shiboski, S., Powell, K., Jay, N., Hanson, E., Miller, S., Clayton, L., Farhat, S., Broering, J., Darragh, T. & Palefsky, J. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*, 285, 2995-3002.

Munoz, N., Castellsague, X., De Gonzalez, A. B. & Gissmann, L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1-10.

Munoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J. S., Shah, K. V., Meijer, C. J. & Bosch, F. X. 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359, 1093-101.

Narisawa-Saito, M. & Kiyono, T. 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*, 98, 1505-11.

Navarro, C., Jolly, A., Nair, R. & Chen, Y. 2002. Risk factors for genital chlamydial infection. *Can J Infect Dis*, 13, 195-207.

Nobbenhuis, M. A., Helmerhorst, T. J., Van Den Brule, A. J., Rozendaal, L., Jaspars, L. H., Voorhorst, F. J., Verheijen, R. H. & Meijer, C. J. 2002. Primary screening for high risk HPV by home obtained cervicovaginal lavage is an alternative screening tool for unscreened women. *J Clin Pathol*, 55, 435-9.

Nobre, R. J., Cruz, E., Real, O., De Almeida, L. P. & Martins, T. C. 2010. Characterization of common and rare human papillomaviruses in Portuguese women by the polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism and sequencing. *J Med Virol*, 82, 1024-32.

Nobre, R. J., De Almeida, L. P. & Martins, T. C. 2008. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol*, 42, 13-21.

Norman, J. 2002. Epidemiology of female genital Chlamydia trachomatis infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 16, 775-87.

Oliveira, L. H., Ferreira, M. D., Augusto, E. F., Melgaco, F. G., Santos, L. S., Cavalcanti, S. M. & Rosa, M. L. 2010. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43, 4-8.

Paba, P., Bonifacio, D., Di Bonito, L., Ombres, D., Favalli, C., Syrjanen, K. & Ciotti, M. 2008. Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer

and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. *Intervirology*, 51, 230-4.

Padez, C. & Rocha, M. A. 2003. Age at menarche in Coimbra (Portugal) school girls: a note on the secular changes. *Ann Hum Biol*, 30, 622-32.

Palmer, H. J. & Paulson, K. E. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev*, 55, 353-61.

Petignat, P., Faltin, D. L., Bruchim, I., Tramer, M. R., Franco, E. L. & Coutlee, F. 2007. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 105, 530-5.

Peto, J., Gilham, C., Fletcher, O. & Matthews, F. E. 2004. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*, 364, 249-56.

Pinheiro, P. S., Tyczynski, J. E., Bray, F., Amado, J., Matos, E. & Parkin, D. M. 2003. Cancer incidence and mortality in Portugal. *Eur J Cancer*, 39, 2507-20.

Porras, C., Safaeian, M., Gonzalez, P., Hildesheim, A., Silva, S., Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Wacholder, S., Freer, E., Quint, K., Bratti, C., Espinoza, A., Cortes, B. & Herrero, R. 2008. Epidemiology of genital Chlamydia trachomatis infection among young women in Costa Rica. *Sex Transm Dis*, 35, 461-8.

Puolakkainen, M., Ukkonen, P. & Saikku, P. 1989. The seroepidemiology of Chlamydiae in Finland over the period 1971 to 1987. *Epidemiol Infect*, 102, 287-95.

QIAGEN 2010. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. In: Qiagen (ed.).

Rasmussen, S. J., Eckmann, L., Quayle, A. J., Shen, L., Zhang, Y. X., Anderson, D. J., Fierer, J., Stephens, R. S. & Kagnoff, M. F. 1997. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*, 99, 77-87.

Reesink-Peters, N., Ossewaarde, J. M., Van Der Zee, A. G., Quint, W. G., Burger, M. P. & Adriaanse, A. H. 2001. No association of anti-Chlamydia trachomatis antibodies and severity of cervical neoplasia. *Sex Transm Infect*, 77, 101-2.

Ronco, G., Cuzick, J., Pierotti, P., Cariaggi, M. P., Dalla Palma, P., Naldoni, C., Ghiringhello, B., Giorgi-Rossi, P., Minucci, D., Parisio, F., Pojer, A., Schiboni, M. L., Sintoni, C., Zorzi, M., Segnan, N. & Confortini, M. 2007. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ*, 335, 28.

Salmeron, J., Lazcano-Ponce, E., Lorincz, A., Herneez, M., Herneez, P., Leyva, A., Uribe, M., Manzanares, H., Antunez, A., Carmona, E., Ronnett, B. M., Sherman, M. E., Bishai, D., Ferris, D., Flores, Y., Yunes, E. & Shah, K. V. 2003. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control*, 14, 505-12.

Santos, A. M., Sousa, H., Catarino, R., Pinto, D., Pereira, D., Vasconcelos, A., Matos, A., Lopes, C. & Medeiros, R. 2005. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet*, 159, 143-7.

Schachter, J., Hill, E. C., King, E. B., Coleman, V. R., Jones, P. & Meyer, K. F. 1975. Chlamydial infection in women with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 123(7), 753-7.

Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Sherman, M. E., Bratti, M., Wacholder, S., Alfaro, M., Hutchinson, M., Morales, J., Greenberg, M. D. & Lorincz, A. T. 2000. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA*, 283, 87-93.

Sellers, J. W., Mahony, J. B., Kaczorowski, J., Lytwyn, A., Bangura, H., Chong, S., Lorincz, A., Dalby, D. M., Janjusevic, V. & Keller, J. L. 2000. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ*, 163, 503-8.

Silins, I., Ryd, W., Stre, A., Wadell, G., Tornberg, S., Hansson, B. G., Wang, X., Arnheim, L., Dahl, V., Bremell, D., Persson, K., Dillner, J. & Ryleer, E. 2005. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer*, 116, 110-5.

Silins, I., Tedeschi, R. M., Kallings, I. & Dillner, J. 2002. Clustering of seropositivities for sexually transmitted infections. *Sex Transm Dis*, 29, 207-11.

Smith, J. S., Bosetti, C., Munoz, N., Herrero, R., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., Meijer, C. J., Van Den Brule, A. J., Franceschi, S. & Peeling, R. W. 2004. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*, 111, 431-9.

Smith, J. S., Munoz, N., Herrero, R., Eluf-Neto, J., Ngelangel, C., Franceschi, S., Bosch, F. X., Walboomers, J. M. & Peeling, R. W. 2002. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis*, 185, 324-31.

Snijders, P. J., Steenbergen, R. D., Heideman, D. A. & Meijer, C. J. 2006. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol*, 208, 152-64.

Stanley, M. A. 2009. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*, 130, 266-76.

Steben, M. & Duarte-Franco, E. 2007. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, 107, S2-5.

Tabora, N., Zelaya, A., Bakkers, J., Melchers, W. J. & Ferrera, A. 2005. Chlamydia trachomatis and genital human papillomavirus infections in female university students in Honduras. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 50-3.

Taha, N. S., Focchi, J., Ribalta, J. C., Castelo, A., Lorincz, A. & Dores, G. B. 2006. Universal Collection Medium (UCM) is as suitable as the Standard Transport Medium (STM) for Hybrid Capture II (HC-2) assay. *J Clin Virol*, 36, 32-5.

Trottier, H. & Burchell, A. N. 2009. Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*, 12, 291-307.

Trottier, H. & Franco, E. L. 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24 Suppl 1, S1-15.

Villa, L. L. & Denny, L. 2006. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 94, S71---S80.

Wallin, K. L., Wiklund, F., Luostarinen, T., Angstrom, T., Anttila, T., Bergman, F., Hallmans, G., Ikaheimo, I., Koskela, P., Lehtinen, M., Stendahl, U., Paavonen, J. & Dillner, J. 2002. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer*, 101, 371-4.

Weinstock, H., Berman, S. & Cates, W., Jr. 2004. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*, 36, 6-10.

WHO, E. R. 2005. <http://data.euro.who.int/cisid/?TabID=256984>. [Visualizado em Novembro de 2010].

Wiesenfeld, H. C., Lowry, D. L., Heine, R. P., Krohn, M. A., Bittner, H., Kellinger, K., Shultz, M. & Sweet, R. L. 2001. Self-collection of vaginal swabs for the detection of Chlamydia, gonorrhoea, and trichomoniasis: opportunity to encourage sexually transmitted disease testing among adolescents. *Sex Transm Dis*, 28, 321-5.

Wilson, J. S., Honey, E., Templeton, A., Paavonen, J., Mardh, P. A. & Stray-Pedersen, B. 2002. A systematic review of the prevalence of Chlamydia trachomatis among European women. *Hum Reprod Update*, 8, 385-94.

Winer, R. L., Lee, S. K., Hughes, J. P., Adam, D. E., Kiviat, N. B. & Koutsky, L. A. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 157, 218-26.

Woodman, C. B., Collins, S., Rollason, T. P., Winter, H., Bailey, A., Yates, M. & Young, L. S. 2003. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 361, 40-3.

Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T. P. & Young, L. S. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 357, 1831-6.

Woodman, C. B., Collins, S. I. & Young, L. S. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7, 11-22.

Wright, T. C., Jr., Massad, L. S., Dunton, C. J., Spitzer, M., Wilkinson, E. J. & Solomon, D. 2007. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol*, 197, 340-5.

Zereu, M., Zettler, C. G., Cambruzzi, E. & Zelmanowicz, A. 2007. Herpes simplex virus type 2 and Chlamydia trachomatis in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 105, 172-5.

Zheng, Z. M. & Baker, C. C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11, 2286-302.

Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2, 342-50.

Zur Hausen, H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384, 260-5.

## **VIII. ANEXOS**

### **Anexo 1: Inquérito realizado às participantes**



Universidade Fernando Pessoa

Nº AMOSTRA

Este questionário destina-se a um estudo intitulado de “Caracterização molecular de agentes infecciosos associados ao desenvolvimento do cancro do colo do útero em jovens no Norte de Portugal: Estudo do Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis*.”

É um questionário anónimo, pelo que agradeço a sua colaboração sincera para que a informação recolhida seja fidedigna.

Estabelecimento de ensino: \_\_\_\_\_

Ano: \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ (anos)

Idade da 1ª menstruação: \_\_\_\_\_ (anos)

Contraceção?  Sim  Não

Tipo:  Pílula  Anel Vaginal  Transdémica  Preservativo

Idade da 1ª relação sexual: \_\_\_\_\_ (anos)

Nº de parceiros sexuais (ao longo da vida):  0  1  2-5  5-10  >  
10

Diagnóstico anterior de Doença Sexualmente Transmissível (DST):

Papilomavírus Humano (HPV)  Hepatite  Outras  
 Herpesvírus simples (HSV)  Clamídia  
 Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)  Gonorreia

Hábitos tabágicos:  Não  Sim Nº de Cigarros por dia \_\_\_\_\_

Fez a vacina contra o HPV?

Não  Sim Qual? \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

O questionário termina aqui. Agradeço a sua colaboração.